

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA  
IN  
BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE IN MEDICINA VETERINARIA  
XXI –CICLO  
2005-2006/2007-2008**

**RUOLO DELLE INTEGRINE NELLA PATOGENESI DELLA  
*LISTERIA MONOCYTOGENES***

**Coordinatore:  
Chiar.mo Prof.  
GIUSEPPE PAINO**

**Tutor:  
Chiar.ma Prof.ssa  
NORMA STAIANO**

**Candidata:  
CLEMENTINA AURIEMMA**

# INDICE

## 1- INTRODUZIONE

1.1. Il contesto.....	3
1.2. <i>L. monocytogenes</i> e listeriosi.....	6
1.3. Le internaline: principali fattori di virulenza coinvolti nell'invasione cellulare.....	10
1.4. Meccanismi di internalizzazione mediati dall' InlA e InlB.....	16
1.5. Integrine e patogenesi batterica.....	22

2- SCOPO E ARTICOLAZIONE DEL LAVORO DI TESI.....	33
--	----

## 3- MATERIALI E METODI

3.1. Reagenti.....	35
3.2. Anticorpi.....	35
3.3. Colture cellulari e batteriche.....	36
3.4. Saggi di adesione e invasione batterica.....	37
3.5. Test di adesione.....	37
3.6. Preparazione dei lisati cellulari, immunoprecipitazione, Western blot.....	38

## 4- RISULTATI

4.1. L'effetto del MOI sull' "uptake" batterico.....	40
4.2. L'"uptake" batterico dipende dalla capacità di adesione della <i>Listeria</i> .....	42
4.3. L'effetto inibitorio degli anticorpi e delle disintegrine sull' "uptake" batterico.....	44
4.4. L'infezione modula la fosforilazione di Met, FAK e paxillina.....	48

5- DISCUSSIONE.....	51
---------------------	----

6- BIBLIOGRAFIA.....	59
----------------------	----

7- RINGRAZIAMENTI.....	82
------------------------	----

## 1-INTRODUZIONE

### 1.1. Il contesto

Le malattie infettive causate dai batteri patogeni sono una delle principali cause di mortalità in tutto il mondo. Fra i differenti tipi di batteri patogeni noti, la *Listeria monocytogenes* ha suscitato una notevole attenzione nell'ambito della sanità pubblica per la sua potenziale gravità legata alle epidemie che si sono manifestate, anche in anni recenti, nei nostri Paesi, in seguito alla distribuzione di cibo contaminato attraverso le grandi catene di ristorazione.

La *Listeria monocytogenes* viene, infatti, annoverata nel gruppo di batteri responsabili delle cosiddette malattie alimentari (Tab.1). La trasmissione “food-borne” di questo microrganismo è stata dimostrata in maniera definitiva nel 1983, dopo il riconoscimento nel Nord America e in Europa di alcuni focolai epidemici correlabili al consumo di cibi contaminati (1).

Questo microrganismo fu descritto per la prima volta come *Bacterium monocytogenes* nel 1926 quale agente di monocitosi in conigli infettati artificialmente con un piccolo bacillo Gram-positivo isolato durante un'epidemia verificatasi spontaneamente in animali da laboratorio (2). Da allora, *Listeria monocytogenes*, denominata *Listerella hepatolytica* da Pirie nel 1927 e riclassificata dallo stesso autore come *Listeria monocytogenes* nel 1940, è stata isolata dal sangue e dal liquido cerebrospinale di pazienti umani, in animali selvatici e domestici, nel tratto gastrointestinale di uomini e animali sani.

Il primo caso di listeriosi umana risale al 1929; Nyfeldt isolò il germe da colture di sangue di individui che presentavano un'infezione simile alla mononucleosi (3); nel 1936 Burn, invece, riportò il primo caso perinatale negli Stati Uniti. La prima evidenza di listeriosi umana trasmessa dagli alimenti si ebbe nel 1953 quando *Listeria monocytogenes* fu isolata da vacche affette da mastite e da gemelli nati morti da una donna che aveva consumato latte crudo dello stesso animale. Fino a quel periodo la *Listeria* fu associata quasi esclusivamente con attive

infezioni umane o animali, risultando la listeriosi, nella maggior parte dei casi, una malattia sporadica le cui sorgenti e vie di infezione rimanevano oscure (4).

Nel 1940 viene inserita nella Divisione II, Sezione 14 del Bergey's Manual (5), con l'attuale denominazione di *Listeria*, dal nome del chirurgo inglese Lord J. Lister che per primo la isolò.

**Tabella 1. Batteri e tossinfezioni alimentari**

<b>Microrganismo</b>	<b>Principali alimenti contaminati</b>	<b>Meccanismo</b>
<i>Salmonella spp.</i>	carne, pollame, uova, pesce	colonizzazione enterica, produzione di endotossine
<i>Staphylococcus aureus</i>	prosciutto, pollame, pasticci di carne, creme a base di uova	produzione negli alimenti di enterotossine
<i>Bacillus cereus</i>	Riso	produzione negli alimenti di enterotossine
<i>Vibrio parahaemolyticum</i>	pesce, molluschi	colonizzazione enterica
<i>Clostridium botulinum</i>	alimenti affumicati, conservati in scatola, in salamoia, sottaceti	neurotossina preformata negli alimenti
<i>Escherichia coli</i>	alimenti crudi e cotti, acqua	produzione a livello intestinale di enterotossine termolabili e termostabili
<i>Listeria monocytogenes</i>	vegetali, carni crude, prodotti a base di carne, latte crudo e latticini	colonizzazione enterica
<i>Yersinia enterocolitica</i>	acqua, latticini, carne (princ. di maiale)	colonizzazione enterica
<i>Campylobacter jejuni</i>	pollame malcotto, pesci, molluschi, latte, acqua	colonizzazione enterica

## 1.2. *Listeria monocytogenes* e listeriosi

I batteri del genere *Listeria* appartengono alla famiglia delle Corynebacteriaceae, microrganismi di forma bastoncellare (1-1.5mm), pleomorfi, Gram positivi, che tendono a disporsi a “palizzata” o a “lettere cinesi” (per tale motivo le listerie sono state assimilate ai corinebatteri) (6). Aerobi-anaerobi facoltativi, ossidasi negativi, incapaci di ridurre i nitrati a nitriti, sono catalasi positivi e capaci di idrolizzare l’esculina ad esculetina. Sono acapsulati, asporigeni e mobili per la presenza di flagelli peritrichi; la mobilità è cosiddetta “rocambolesca” e si rileva solo nei ceppi che crescono a 25°C. *Listeria monocytogenes* è capace di fermentare il ramnosio e lo xilosio, è  $\beta$ -emolitica e mostra una reazione emolitica sinergica con *Staphylococcus aureus* nel cosiddetto “Camp test” (da Christie, Atkins e Munch-Peterson) (7, 8).

In realtà, non tutti i ceppi di *Listeria monocytogenes* risultano emolitici, in quanto non tutti producono una emolisina, chiamata listeriolisina-O (LLO), ma tutti i ceppi patogeni sono emolitici (9) e la loro virulenza varia sensibilmente da ceppo a ceppo (10). Malgrado ciò, tutti i ceppi di *Listeria monocytogenes*, anche quelli debolmente patogeni e non-patogeni, che raramente vengono isolati, devono essere considerati quali potenziali agenti di malattia in quanto non è stata ancora individuata una correlazione tra i fattori di virulenza e capacità di provocare o meno manifestazioni morbose (9, 11).

Sulla base dei differenti antigeni somatici e flagellari si distinguono 13 sierotipi di *Listeria monocytogenes* che sono suddivisi in 5 gruppi principali, 1, 2, 3, 4a e 4b, non specie-specifici. I sierotipi più ricorrenti (>95%) negli isolati clinici umani sono: 1/2 a, 1/2b e 4b; il 4b è quello che determina la più alta percentuale di epidemie umane e di casi sporadici, mentre negli alimenti si reperiscono con maggiore frequenza l’1/2a, l’1/2b e l’1/2c. Il maggior numero di *Listeria monocytogenes* isolata da pazienti e dall’ambiente sono di tipo 1 o 4 (7, 12, 13).

Per quanto riguarda le caratteristiche fisico-chimiche, *Listeria monocytogenes* è in grado di moltiplicarsi a temperature di refrigerazione (psicrotrofia), a pH compresi tra 4.6 e 9.2, e con valori di attività dell’acqua (aw) superiori a 0.90-0.92. Non è particolarmente resistente al calore rispetto alle altre specie Gram positive e, in

assenza di materiali organici, è sensibile a vari disinfettanti tra cui l'ipoclorito di sodio e i sali quaternari d'ammonio; cresce in presenza di concentrazioni di NaCl superiori al 10%. (4, 6).

Esistono in natura sei specie di *Listeria*, e precisamente *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. monocytogenes*; solo quest'ultima è la specie maggiormente implicata nei casi di infezione nell'uomo. Per quanto riguarda *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* solo raramente causano patologia, *L. grayi* e *L. innocua* sono, invece, considerate apatogene.

La *Listeria monocytogenes* è una specie ubiquitaria: si può trovare nel suolo, nelle piante, nell'acqua, nei concimi di origine animale. È veicolata dalle feci dell'uomo (2-6% di portatori) e degli animali quali vitelli, pollame, maiali (10-50% di portatori). Negli animali da reddito una delle principali fonti di infezione è rappresentata dall'insilato, nel quale *Listeria monocytogenes* può essere riscontrata in concentrazioni elevate, in particolare a livello degli strati superficiali e marginali, specialmente durante la stagione invernale, a causa di un'insufficiente acidificazione ( $\text{pH} > 4,5$ ).

La sua capacità di vivere e moltiplicarsi alle basse temperature rende la *Listeria monocytogenes* facilmente reperibile nei cibi destinati al consumo crudo, i cosiddetti "ready to eat" (RTE); tra i prodotti ittici, il pesce affumicato e marinato sono i cibi maggiormente a rischio.

*Listeria monocytogenes* è stata spesso isolata dagli animali, sia domestici (pecore, bovini, polli), che selvatici. Ne è stata più volte segnalata la diffusione nei volatili, peraltro poco sensibili all'infezione e, secondo alcuni Autori, anche i ratti rappresentano un importante serbatoio di tale patogeno (14). E' stato, inoltre, ipotizzato il ruolo di vettori di infezione rivestito da alcuni artropodi, quali zecche e tabanidi (15).

*Listeria monocytogenes*, agente eziologico della listeriosi, è un patogeno opportunista che colpisce più frequentemente alcune categorie di individui: pazienti sottoposti a terapia immunosoppressiva, affetti di AIDS o da malattie croniche, come ad esempio la cirrosi, che compromettono il sistema immunitario, donne in gravidanza, neonati ed anziani.

Le forme cliniche di listeriosi possono essere distinte in due categorie: invasiva e non invasiva. Quest'ultima, riportabile ad una gastroenterite febbrile, è caratterizzata da sintomi gastro-enterici con diarrea, febbre, cefalea e mialgia, dopo un breve periodo di incubazione.

Nella listeriosi invasiva, invece, il periodo di incubazione può essere molto lungo: normalmente va da 2 a 3 settimane, ma occasionalmente arriva fino a 3 mesi. In questa forma di malattia, *Listeria monocytogenes* penetra nella mucosa intestinale e, dopo una prima fase di adesione e moltiplicazione, si diffonde per via ematogena al fegato, all'utero gravido e al sistema nervoso centrale. E' possibile anche che tale microrganismo penetri nell'organismo attraverso piccole ferite presenti nel cavo orale, nella faringe o nell'esofago; più raramente l'infezione avviene attraverso le vie respiratorie. Nella donna in gravidanza si può avere aborto, nascita prematura o malattia neonatale del bambino (16).

Dal punto di vista epidemiologico, la listeriosi è caratterizzata da una relativa frequenza di casi sporadici di origine soprattutto alimentare (17) e dall'occasionale segnalazione di veri e propri focolai.

Le principali forme invasive di listeriosi sono tre:

- meningoencefalite, a rapida evoluzione e mortalità elevata;
- granulomatosi settica o tifo-pneumonica, con focolai di tipo miliare a fegato, milza, e polmoni e mortalità compresa tra il 30 e il 50%;
- granulomatosis infantiseptica o listeriosi neonatale, per lo più conseguente ad infezione transplacentare, caratterizzata da formazioni granulomatose nei visceri, dette listeriommi, da lesioni esantemiche e da morte poco prima o poco dopo la nascita.

Sono state segnalate anche altre forme meno comuni: oculo-ghiandolare, caratterizzata da congiuntivite purulenta ed interessamento dei linfonodi regionali; cervico-ghiandolare, con interessamento dei linfonodi cervicali; anginoso-settica, con fenomeni di angina a decorso benigno; esantemica, con eritema di tipo papuloso (18).

Negli animali la listeriosi si presenta con alcune differenze a seconda della specie. Si distinguono la forma setticemica, neurologica ed abortigena, che sono frequenti soprattutto nei bovini, pecore e capre. Negli equini



prevale, invece, la forma meningo-encefalica, nei suini, che contraggono raramente la listeriosi, e nei volatili si ha setticemia seguita da sintomi di natura nervosa; gli uccelli di solito sono portatori asintomatici, ammalandosi eventualmente nelle prime settimane di vita per morire poi improvvisamente. Nei ruminanti si può riscontrare anche la mastite da *Listeria monocytogenes* e la forma oculo-ghiandolare (7).

I quadri sintomatologici negli animali si presentano talvolta con le stesse modalità osservate per l'uomo: ad esempio, la forma neurologica nei ruminanti compare soprattutto negli animali adulti, mentre quella setticemica, fatta eccezione per gli ovini dove non ci sono distinzioni in base all'età, predilige gli animali giovani.

La listeriosi di tipo alimentare è una malattia piuttosto rara ma grave, con un tasso di mortalità (20-30%) paragonabile a quello di altre malattie alimentari, quali ad esempio la salmonellosi. In relazione alla sua incidenza e alla sua gravità, l'impatto economico e sociale della listeriosi è considerato tra i più alti fra le malattie di origine alimentare.

L'incidenza annuale della listeriosi è compresa in un range da 0.1 a 11.3 casi per milione di persone; in particolare è di 0.3-7.5 casi per milione in Europa (dati EFSA, Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare), 4.4 casi per milione negli Stati Uniti e 3 casi per milione in Australia (19). La valutazione di tali dati deve considerare numerosi fattori, primo dei quali è sicuramente la differente qualità ed efficacia dei piani nazionali di sorveglianza nei diversi Paesi.

La listeriosi è stata evidenziata soprattutto nei Paesi industrializzati, ma non è noto se le differenze nei tassi di incidenza dei Paesi industrializzati e di quelli in via di sviluppo siano il riflesso di differenze geografiche e di abitudini alimentari oppure delle diverse situazioni relative alla diagnosi e alle pratiche di segnalazione.

In Italia i casi di listeriosi vengono segnalati al Ministero della Salute attraverso il sistema di notifica obbligatorio delle malattie infettive che è in vigore seppure in forma modificata dal 1934. Tra il 1995 e il 2004 sono stati registrati 41 episodi/anno, su questo dato incidono in particolar modo i 68 casi registrati nel 1997, quando circa 1500 persone furono coinvolte in un'epidemia derivata dal consumo di insalata di mais e tonno contaminata (20).

Gli alimenti principalmente coinvolti nella trasmissione di *Listeria monocytogenes* all'uomo sono i prodotti lattiero-caseari, in particolare i formaggi a pasta molle ottenuti da latte non pastorizzato, le carni, i prodotti ittici e le verdure (21, 22).

Essendo una zoonosi trasmissibile attraverso il consumo di alimenti contaminati e per le conseguenti ripercussioni che può avere sulla salute pubblica e l'economia, la listeriosi è stata inclusa nella Direttiva Europea 2003/99 riguardante il monitoraggio delle zoonosi e degli agenti zoonotici; è stata recepita in Italia con il Decreto numero 191 del 04 aprile 2006 ed è menzionata nell'allegato 1 tra “le zoonosi e gli agenti zoonotici che devono essere sottoposti a sorveglianza” (23, 24).

L'attenzione nei confronti di *Listeria monocytogenes* da parte dell'industria alimentare si deve anche alle possibili restrizioni al commercio che possono essere stabilite quale conseguenza del riscontro di eventuali contaminazioni dei prodotti pronti per il consumo. Grazie all'accordo sulle misure sanitarie e fitosanitarie, ratificato il 1° gennaio 1995 dall'Organizzazione Mondiale per il Commercio (WTO), un Paese può, infatti, applicare restrizioni alle importazioni di animali e prodotti di origine animale per proteggere la salute dei propri cittadini.

E' stato stimato che una parte della popolazione umana, dal 2 al 10%, è portatore sano di *Listeria* a livello intestinale, ingerendole frequentemente senza alcun effetto; è, dunque, probabile che la patogenicità sia legata a peculiari e ancora non ben chiarite modalità di interazione tra ambiente, batterio ed ospite.

### **1.3. Le internaline: principali fattori di virulenza coinvolti nell'invasione cellulare**

La patogenesi della listeriosi dipende principalmente dalla capacità della *Listeria monocytogenes* di invadere, replicarsi e sopravvivere all'interno di differenti tipi cellulari che includono cellule non-fagocitiche e macrofagi.

In tutti i tipi cellulari, l'internalizzazione del batterio è rapidamente seguita dalla lisi del vacuolo fagocitico ad opera della listeriolisina O (LLO) batterica, che consente la liberazione del batterio nel citosol. In

questo compartimento, la *Listeria* si replica e si sposta utilizzando le proteine contrattili della cellula ospite. ActA è stata identificata quale proteina di superficie batterica responsabile del movimento intracellulare; essa mima l'attività delle proteine WASP ("Wiskott Aldrich Syndrome Protein"), fattori di nucleazione dell'actina, inducendo la polimerizzazione dell'actina e la formazione di strutture note come "actin comet tails" che consentono il movimento nel citosol cellulare. Il batterio raggiunge la membrana cellulare e mediante la formazione di pseudopodi, o più precisamente "listeriopodi", viene rilasciato nelle cellule adiacenti diffondendosi in tutto l'organismo.

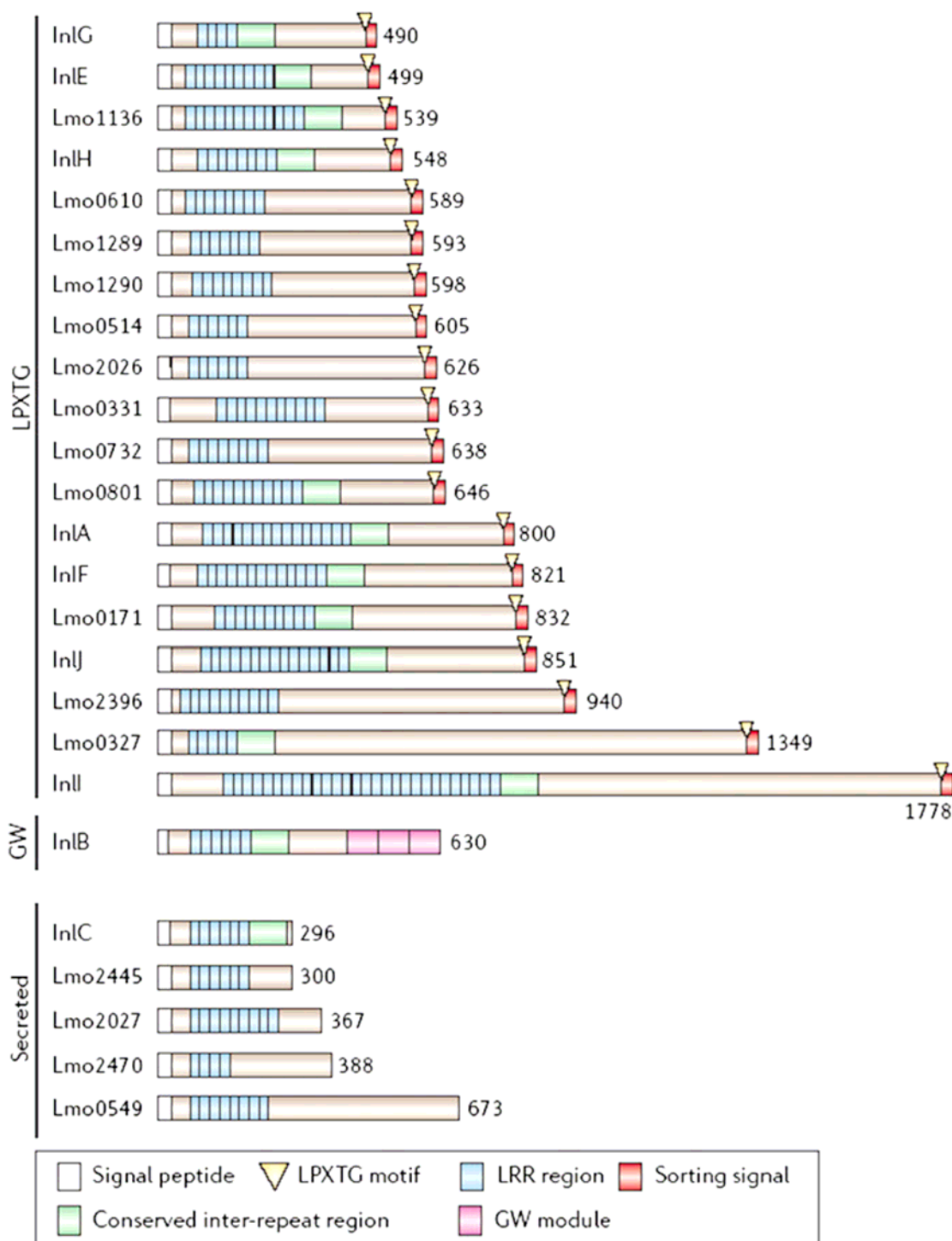
Dal 1986, quando la genetica fu applicata allo studio della virulenza della *Listeria monocytogenes*, furono identificati diversi geni e proteine direttamente coinvolti nelle varie fasi del processo infettivo. In particolare, il sequenziamento dell'intero genoma del ceppo EGDs di *Listeria monocytogenes* ha consentito di identificare due "clusters" di geni necessari per l'invasione e la replicazione intracellulare.

Il primo "cluster" identificato si riferisce a "l'isola di patogenicità 1 di *Listeria monocytogenes* (LIPI-1)", codificante per un set di geni coinvolti nell'infezione di cellule e tessuti, nel superamento da parte del batterio dei vacuoli fagocitici, nella replicazione citosolica, nella motilità actinica e nella diffusione cellulare (25).

Il secondo "cluster" comprende, invece, solo due geni che formano un operone, *InlA* e *InlB*, che codificano fattori di invasione necessari per l'adesione e l'invasione cellulare in cellule non-fagocitiche.

Esse sono proteine superficiali batteriche che vanno a costituire il complesso proteomico superficiale noto come "surfaceome", la cui caratterizzazione ha permesso di comprendere meglio la capacità di sopravvivenza di questo patogeno in diversi ambienti, quali alimenti e citosol di cellule.

*InlA* e *InlB* fanno parte di una grande famiglia di proteine superficiali che consta di 25 membri le cui caratteristiche strutturali sono schematicamente rappresentate in Figura 1 (26).



**FIG.1. La famiglia delle internaline.** Questo gruppo di proteine (24 membri nella *Listeria monocytogenes*), presenta all'N-terminale una regione ripetuta ricca di residui di leucina (LRR). Diciannove internaline, tra cui l'InIA, sono legate covalentemente alla superficie batterica mediante un motivo LPXTG (X indica qualsiasi amminoacido). Solo l'InIB presenta al C- terminale il modulo GW per ancorarsi alla superficie batterica. Cinque internaline, tra cui InIC, non presentano alcun segnale di ancoraggio perché sono proteine secrete.

Tutte mostrano un'architettura comune, con una sequenza segnale all'N-terminale e un dominio ricco di residui di leucina (LRRs) che comprende da 3 (Lmo2445) a 28 (InII) ripetizioni di circa 22 amminoacidi ciascuno, seguito da una regione interna ripetuta immunoglobulina-simile (IR) e una regione C-terminale che media l' ancoraggio del batterio alla superficie cellulare (26).

Sulla base del differente modo di interagire con la superficie batterica, le internaline vengono divise in tre gruppi: internaline LPXTG, GW e internaline secrete.

Si conoscono diciannove internaline LPXTG, tutte caratterizzate da un corto segnale "sorting" al C-terminale mediante il quale si legano covalentemente ai peptidoglicani.

Il segnale consiste di un motivo LPXTG, seguito da un dominio idrofobico di circa 20 amminoacidi e una coda di residui carichi positivamente. Il segnale "sorting" è il substrato di una sortasi A (SrtA), una transpeptidasi legata alla membrana che taglia il motivo LPXTG a livello dei residui di treonina e glicina, catalizzando la formazione di un legame ammidico tra il gruppo carbossilico della treonina e i precursori della parete cellulare (27, 28, 29).

La proteina LPXTG maggiormente studiata della *Listeria monocytogenes* è l'internalina A (InIA), una proteina di 800 amminoacidi le cui regioni LRR e IR (dominio ripetuto interno conservato) sembrano essere sufficienti ad indurre l'entrata della *Listeria* nelle cellule bersaglio *in vitro*. (30, 31)

L'InIA media il riconoscimento e l'invasione delle cellule epiteliali mediante una specifica interazione con L'E-caderina (E-cad), un membro della superfamiglia delle caderine, molecole di adesione cellulare calcio-dipendenti, coinvolte nella formazione delle giunzioni aderenti di cellule epiteliali polarizzate di differenti tessuti.

I domini extracellulari delle caderine, di cui l'E-caderina fa parte, stabiliscono un legame omofilico tra cellule adiacenti, mentre il loro dominio citoplasmatico media l'associazione di molecole di adesione cellulare al citoscheletro regolando la stabilità e la ritenzione delle caderine alla membrana cellulare.

L'InIA non mostra similarità strutturali all'E-caderina e il dominio dell'E-caderina coinvolto nell'interazione omofilica è differente da quello coinvolto nel legame con l'InIA, suggerendo che l'InIA può interagire durante l'entrata con molecole di E-caderina che sono già impegnate in un altro legame (32).

Una prolina in posizione 16 dell'E-caderina è critica per l'interazione con la LRR dell'InlA; infatti, specie come il topo e il ratto che presentano nella stessa posizione un glutammato, sono incapaci di interagire con l'InlA (33).

L'interazione InlA/E-caderina sembra svolgere un ruolo importante nell'attraversamento della barriera intestinale e di quella materno-fetale (34, 35, 36, 37).

In particolare, la creazione di topi transgenici che esprimono l'E-caderina umana (hEcad) a livello intestinale (Tg-hEcad mice) hanno rivelato un ruolo prominente dell'InlA nell'attraversamento della barriera intestinale (34).

L'E-caderina è localizzata prevalentemente a livello della superficie basolaterale degli enterociti polarizzati, per cui inizialmente non era chiaro come i batteri nel lume intestinale accedessero a questo recettore (35). Studi recenti hanno rivelato che la *Listeria* interagisce con l'E-caderina che viene transientemente esposta sulla superficie apicale degli enterociti durante il processo di espulsione delle cellule apoptotiche, un normale processo omeostatico che si verifica nel piccolo intestino e che avviene all'apice dei villi intestinali (36).

Un ruolo, invece, dell'InlA nell'attraversamento della barriera materno- fetale è suggerito dalla presenza dell'E-caderina a livello della superficie basale e apicale del sincizio trofoblasto e dei villi citotrofoblasti della placenta (37). Poichè le cellule epiteliali in contatto con il liquido cefalo-rachidiano esprimono l'E-caderina, l'InlA potrebbe svolgere un ruolo anche nell'attraversamento della barriera emato-encefalica (38).

Il secondo gruppo di proteine superficiali, le internaline GW, presentano nella sequenza C-terminale un dominio con cui si legano mediante interazioni non-covalenti alla parete cellulare. La prima proteina caratterizzata è stata l'InlB, una proteina di 67 kDa il cui dominio C-terminale comprende tre ripetizioni tandem altamente conservate di circa 80 amminoacidi, detti moduli GW, per la presenza del dipeptide Gly-Trp. Tali ripetizioni si avvolgono a formare domini SH3 e mediano una debole associazione della proteina con la superficie batterica attraverso interazioni non-covalenti con l'acido lipotecoico, un polimero ancorato alla membrana presente sulla superficie dei batteri Gram positivi. Quest'interazione, oltre ad essere non-covalente, è dissociabile, tanto che metà dell'InlB è rilasciata dalla parete cellulare in forma solubile.

Sia nella sua forma associata che solubile, l'InlB è capace di interagire con tre molecole presenti sulla superficie delle cellule ospiti: la proteina gC1q-R, il recettore tirosin chinasi Met, noto anche come recettore per il fattore di crescita epatocitario (HGF-R), e i glicosamminoglicani (GAGs) (39, 40, 41).

gC1qR è il primo recettore identificato per l'InlB: si tratta di una glicoproteina di 33 kDa, presente in maniera ubiquitaria a livello delle membrane cellulari, che oltre a legare la testa globulare di C1q, il primo componente del complemento presente nel siero, è capace di interagire con diverse proteine plasmatiche cellulari e batteriche (42).

L'interazione InlB-gC1qR gioca un ruolo importante nell'internalizzazione della *Listeria monocytogenes*, facilitando l'interazione tra InlB e il recettore Met. Il legame tra l'InlB e gC1qR è coinvolto nell'attivazione di PI3K mediante l'associazione di gC1qR con Gab1 fosforilato (39).

Il secondo recettore identificato per l'InlB è il recettore tirosin chinasi e protooncogene Met o recettore per l'HGF (43). Met è un etero-dimero legato da ponti disolfuri, composto di una subunità  $\alpha$  extracellulare di 45 kDa e una subunità  $\beta$  transmembrana di 145 kDa che contiene un dominio catalitico tirosin chinasi (44). Met svolge un ruolo cruciale nella regolazione di diversi processi, quali lo sviluppo cellulare, la degenerazione dei tessuti e l'invasività tumorale (45, 46).

In modo simile al naturale ligando di Met, l'HGF, l'InlB stimola la fosforilazione delle tirosine di Met, il reclutamento e la fosforilazione delle molecole adattatrici Gab1, Cbl e Shc, e la formazione di un complesso con la subunità p85 della chinasi PI3K (44).

L'InlB non presenta, tuttavia, caratteristiche strutturali simili all'HGF che è, invece, correlato agli enzimi coinvolti nella cascata di eventi della coagulazione del sangue (45), né interagisce con Met a livello dello stesso sito (43), né induce la stessa durata di fosforilazione, che risulta essere più transiente quando è indotta dall'InlB (dopo 60 minuti non è rilevabile) rispetto a quella prodotta dall'HGF (invariata anche dopo due ore) (43).

I glicosamminoglicani (GAGs), come i solfati eparinici, sono, invece, polisaccaridi carichi negativamente, la cui presenza sulla superficie di diversi tipi cellulari sembra incrementare notevolmente l'invasione InlB-

dipendente. L'InlB lega, mediante i moduli GW, i GAGs e tale interazione sembra potenziare l'attivazione di Met grazie ad una sorta di sinergia tra i moduli GW che legano i GAGs e il dominio LRRs che innesca l'internalizzazione del batterio (40).

I GAGs possono anche stimolare il rilascio dell'InlB dalla superficie batterica provocando il “clustering” dell'internalina a livello della superficie cellulare, evento che potenzialmente incrementa il reclutamento del recettore Met (40).

All'ultima classe di internaline, le cosiddette internaline secrete, appartengono: InlC, Lmo2445, Lmo2027 e Lmo2470. Esse sono le internaline più piccole, tutte mancano del dominio che ancora la parete cellulare e tutte vengono rilasciate nel mezzo extracellulare. Il prototipo di questa famiglia è l'InlC (o IrpA) il cui ruolo non è stato ancora del tutto chiarito, ma che sembra avere importanza soprattutto negli stadi avanzati dell'infezione, quando la *Listeria* è intracitosolica e nel processo di diffusione intercellulare (47, 48). Si pensa possa svolgere un ruolo di supporto nell'internalizzazione mediata dall'InlA della *L. monocytogenes* nelle cellule non-fagocitiche (49)

#### **1.4. Meccanismi di internalizzazione mediati dall' InlA e InlB**

La *Listeria monocytogenes* appartiene a quei batteri patogeni che nel corso del tempo hanno evoluto diverse strategie per colonizzare nicchie intracellulari eucariotiche. L'internalizzazione del batterio è stata ampiamente studiata in cellule non fagocitiche note anche come “fagociti non professionali”; queste cellule normalmente non ingeriscono microbi e altre grandi particelle, e pertanto, costituiscono eccellenti modelli per caratterizzare gli eventi direttamente guidati dai patogeni.

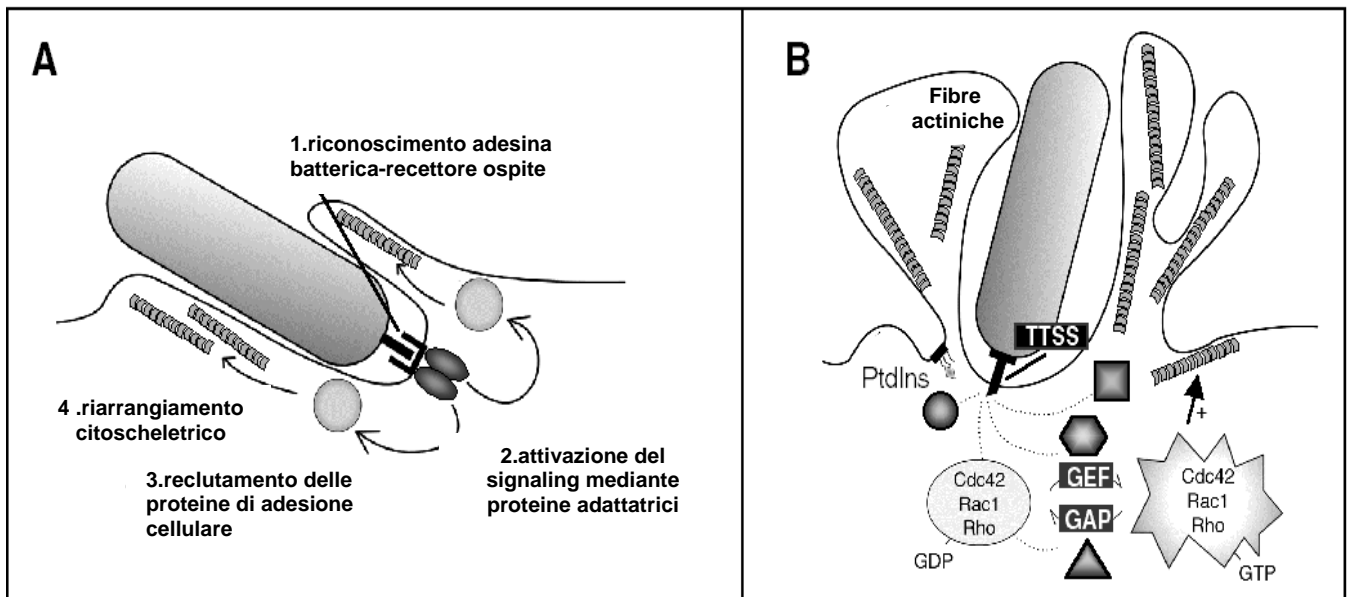
L'impiego di tale modello di infezione ha contribuito a differenziare due meccanismi di ingresso utilizzati dai patogeni, che erano stati inizialmente classificati secondo criteri morfologici (50).

Nel primo meccanismo, “trigger”, proteine batteriche effettrici vengono iniettate nel citosol della cellula ospite inducendo drammatici riarrangiamenti citoscheletrici che consistono nella formazione di filopodi e



lamellipodi a livello del sito di contatto dei batteri con la superficie cellulare dell'ospite eucariotico, culminando con l'ingresso del batterio nella cellula ospite (Fig.2 A-B) (50).

Diversamente dal meccanismo "trigger", nel meccanismo "zipper" o "penetrazione mediata dal recettore", i batteri si legano mediante le loro adesine alle membrane delle cellule ospiti, in particolare, con i recettori della superficie delle cellule ospiti coinvolti nelle adesioni cellula-cellula e cellula-matrice e/o nell'attivazione di proteine regolatrici che modulano il “turnover” del citoscheletro. Queste proteine sono spesso connesse a cascate di segnali attivate da fosforilazioni in tirosina e che conducono, tra gli altri effetti, a riarrangiamenti actinici e alla riorganizzazione delle membrane. *La Listeria monocytogenes*, patogeno intracellulare facoltativo, penetra e infetta la cellula ospite secondo un meccanismo di tipo “zipper” mediato dall’InlA e dall’InlB. (Fig.2 A- B) (50).



**FIG.2. Meccanismi di penetrazione batterica.** (A) Meccanismo “zipper”: i batteri si legano mediante le loro adesine batteriche ai recettori della cellula ospite attivando il “signaling” cellulare che induce un riarrangiamento actinico e una moderata riorganizzazione delle membrane. (B) Meccanismo “trigger”: l’uptake batterico è indotto dall’azione di proteine batteriche effettrici che vengono iniettate nel citosol della cellula ospite mediante il sistema di secrezione di tipo III (TTSS) inducendo drammatici riarrangiamenti citoscheletrici

Studi in vitro che utilizzano linee cellulari di mammifero hanno consentito di comprendere il meccanismo con cui l'interazione InlA-E-caderina promuove la complessa cascata di segnali e la riorganizzazione del citoscheletro che porta all'internalizzazione batterica. Tali studi rivelano che la *Listeria monocytogenes* sovverte le funzioni delle molecole effettrici delle giunzioni aderenti, che includono proteine citosoliche quali l' $\alpha$  e  $\beta$ -catenina, che ancorano il dominio intracellulare dell'E-caderina.(30)

La  $\beta$ -catenina lega il dominio distale della coda intracitoplasmatica dell'E-caderina e recluta la proteina legante l'actina, l' $\alpha$ -catenina: queste due molecole sono normalmente presenti nelle giunzioni aderenti, suggerendo che la *Listeria monocytogenes* sfrutti lo stesso "scaffold molecolare" coinvolto nella formazione delle giunzioni aderenti per promuovere il suo ingresso nelle cellule bersaglio.

Tale ipotesi è stata recentemente confermata dall'identificazione di un nuovo partner dell' $\alpha$ -catenina, la proteina Rho-GAP ARHGAP10, una proteina multidomini con una regione C-terminale che lega l' $\alpha$ -catenina e un dominio centrale (GAP) che può attivare la famiglia Rho delle piccole GTPasi. Poiché è noto il ruolo delle proteine Rho nella regolazione della polimerizzazione dell'actina, il dominio GAP suggerisce una possibile funzione di ARHGAP10 nel rimodellamento del citoscheletro durante l'internalizzazione della *Listeria monocytogenes* (30).

L'importanza della regolazione del dinamismo actinico durante l'internalizzazione della *Listeria monocytogenes* è anche confermato dal coinvolgimento della miosina VIIa che viene reclutata a livello della membrana plasmatica attraverso l'interazione con la coda citoplasmatica della proteina transmembrana vezatina. Queste molecole sembrano regolare la forza contrattile necessaria per l'inglobamento del patogeno (Fig. 3 A).

Il meccanismo mediato, invece, dall'*InlB* prevede un'interazione del dominio internalinico LRR con il dominio extracellulare del recettore Met. Questo legame porta alla dimerizzazione di Met e alla sua attivazione mediante l'autofosforilazione a livello di specifici residui di tirosina. In particolare, l'attivazione del recettore è mediata in parte dalla fosforilazione di due residui tirosinici (Y1234 e Y1235) del dominio tirosin-chinasico, evento che attiva un'attività kinasica intrinseca del recettore, mentre i due residui tirosinici fosforilati presenti al

C-terminale (Y1349 e 1356) formano un sito specifico per diversi trasduttori di segnali e molecole adattatrici (42).

Il recettore attivato fosforila le proteine adattatrici Gab1, Cbl, e Shc; tra queste Gab1 sembra svolgere un ruolo importante nell'attivazione della chinasi PI3K, reclutando la sua subunità regolatrice p85 che, a sua volta, consente l'accesso alla sua subunità attivatrice p110. In questo modo PI3K può agire sul suo substrato, PIP2 (fosfatidilinositolo 3,4-bisfosfato) convertendolo in PIP3 (fosfatidilinositolo 3,4,5- trifosfato), e portando all'aumento transiente dei livelli di PIP2 e PIP3 all'interno della cellula.

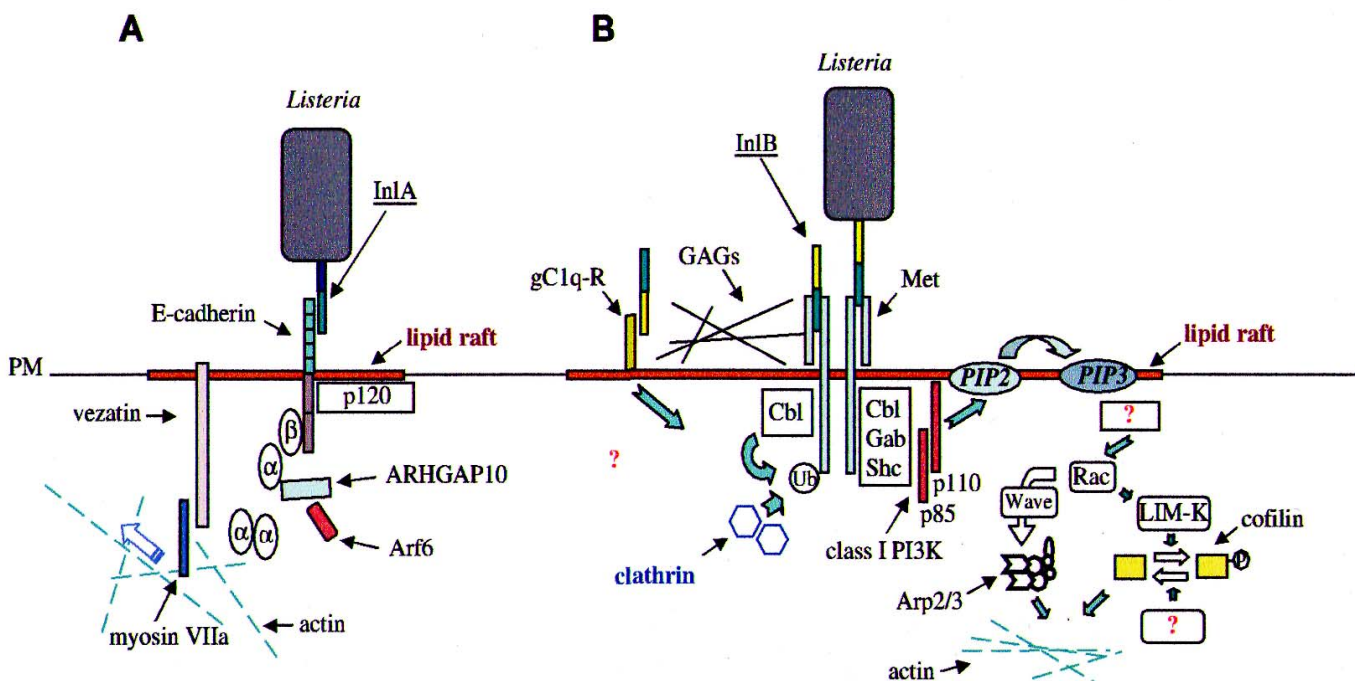
PIP2 e PIP3 agiscono come secondi messaggeri nella regolazione di proteine segnale coinvolte nell'internalizzazione batterica, reclutando il complesso Arp2/3- cofilina, molecole coinvolte nella polimerizzazione dei filamenti di actina, nel riarrangiamento del citoscheletro cellulare e nell'assemblaggio e disassemblaggio della capsula fagocitica necessaria per l'internalizzazione batterica (Fig. 3 B) (42, 51).

Altre risposte cellulari non direttamente legate alla fagocitosi sono mediate dall'InlB; esse rappresentano eventi critici soprattutto per la sopravvivenza cellulare dopo l'internalizzazione del batterio e il suo rilascio nel compartimento citosolico.

L'InlB è in grado di attivare un'isoforma della fosfolipasi C, PLC- $\gamma$ 1, che porta alla formazione di inositolo 1,4,5 trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG). IP3 induce il rilascio di calcio dalle riserve intracellulari, mentre il DAG attiva gli isoenzimi appartenenti alla grande famiglia di protein chinasi C (PKC) calcio/fosfolipidi-dipendenti. Il calcio e la PKC sono entrambi coinvolti nell'invasione batterica, in particolare nelle fasi successive all'internalizzazione, quali il controllo della crescita cellulare e/o l'espressione genica (52).

L'InlB sfrutta il meccanismo di PI3K per attivare il fattore di trascrizione eucariotico NF- $\kappa$ B, importante regolatore di alcuni geni coinvolti nell'infiammazione, nell'immunità, nella risposta a stress e nell'inibizione dell'apoptosi. In cellule non stimulate, NF- $\kappa$ B è sequestrato nel citoplasma da una proteina inibitrice I $\kappa$ B e viene rilasciato solo in seguito alla degradazione proteolitica di I $\kappa$ B indotta da un segnale di fosforilazione.(53)

PI3K attiva l'Akt/protein chinasi B (PKB), la quale, a sua volta, agisce sul complesso I $\kappa$ B chinasi (IKK) che fosforila I $\kappa$ B consentendo al fattore NF- $\kappa$ B di entrare nel nucleo e indurre la trascrizione. Akt/PKB si pensa che abbia un ruolo importante nella protezione delle cellule dall'apoptosi, in particolare nella sopravvivenza della cellula ospite infettata dalla *Listeria monocytogenes*. Dal momento che la *Listeria monocytogenes* è un patogeno intracellulare, la sopravvivenza della cellula ospite rappresenta un requisito importante per la vitalità del batterio e per la sua disseminazione nei tessuti (42).



**FIG.3. Vie di trasduzione dei segnali mediati dalle internaline.** (A) Pathway InlA- mediato. (B) Pathway InlB- mediato.

Studi che utilizzano cellule tissutali in coltura hanno dimostrato che l'InlB è essenziale per l'internalizzazione della *Listeria* nella maggior parte di tipi cellulari non fagocitari, quali gli epatociti, le cellule endoteliali, i fibroblasti e alcune linee cellulari epiteliali. Al contrario, l'invasione mediata dall'InlA è apparentemente ristretta alle cellule che esprimono l'E-caderina, quali quelle dell'epitelio intestinale (50).

E' stata ipotizzata l'esistenza di una possibile sinergia tra le due vie di trasduzione dei segnali InlA- e InlB-dipendenti attivate dall'interazione della *Listeria* con le cellule ospiti. Molteplici evidenze sono a favore di questa ipotesi, prima tra tutte l'appartenenza allo stesso operone delle due internaline che come tali possono essere co-esprese e co-regolate.

E-caderina e Met, i due recettori principali della *Listeria monocytogenes*, sono entrambi localizzati sulla superficie delle cellule epiteliali e possono essere entrambi reclutati durante l'ingresso del batterio. Un'ipotesi interessante è che l'InlB rilasciata dal batterio possa indurre lo “scattering” cellulare, l'apertura delle giunzioni e altri eventi di segnale che stimolano l'interazione InlA-E-caderina. (54).

La *Listeria monocytogenes* sembra, pertanto, beneficiare del “cross- talk” tra i due recettori durante l'internalizzazione. Diversi studi hanno dimostrato che un'efficiente invasione del tessuto placentale richiede sia l'InlA che l'InlB (55) e che l'invasione InlA-dipendente delle cellule epiteliali umane Caco-2 è dieci volte più efficiente in presenza dell'InlB (49). La co-attivazione, pertanto, dell' E- caderina e di Met potrebbe amplificare il “signaling” cellulare responsabile del rimodellamento citoscheletrico legato all'inglobalizzazione del patogeno.

Di notevole importanza è il fatto che mutanti deficitari sia dell'InlA che dell'InlB conservano, anche se con minore efficienza, la capacità di penetrare in cellule non fagocitarie in coltura, suggerendo che anche altre adesine possono promuovere l' internalizzazione della *Listera monocytogenes* nelle cellule ospiti (56, 57).

## 1.5. Integrine e patogenesi batterica

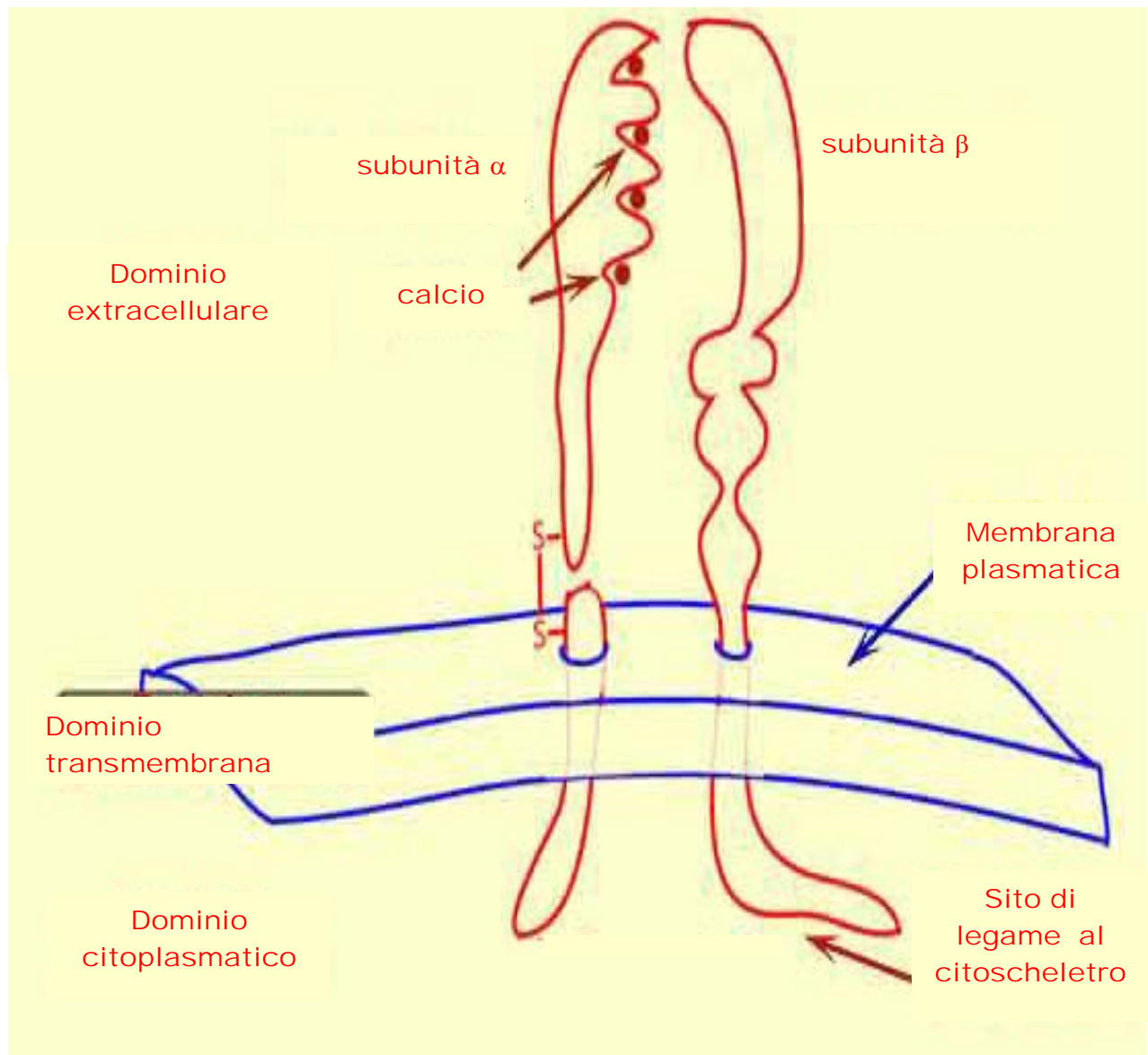
Una strategia utilizzata dalla *Listeria*, ma comune a molti batteri patogeni, prevede la modulazione dell'attività di molecole chiave delle cellule ospiti, tra cui i recettori presenti sulla superficie della membrana cellulare e proteine che regolano il citoscheletro.

Molti batteri sono in grado di legare i recettori integrinici presenti sulla superficie delle cellule ospiti o di legarsi a proteine delle cellule ospiti che interagiscono con le integrine (58). L'utilizzo delle integrine come substrato permette ai batteri patogeni di sfruttare la proprietà di questi recettori di attivare le vie di trasduzione di segnali cellulari.

Le integrine sono glicoproteine della membrana cellulare che regolano molti processi biologici critici per la cellula, quali l'adesione delle cellule a specifiche proteine della matrice extracellulare, la migrazione, la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi (59).

Esse sono recettori eterodimerici costituiti dall'associazione non-covalente delle subunità  $\alpha$  e  $\beta$ , entrambe composte da una porzione globulare extracellulare, un segmento transmembrana e una breve coda intracitoplasmatica. Nell'uomo esistono 19 tipi di subunità  $\alpha$  e 8 tipi di subunità  $\beta$  che eterodimerizzando formano 25 differenti recettori integrinici distinti per specificità e affinità di legame.

La subunità  $\alpha$  presenta quattro segmenti con una sequenza amminoacidica ripetuta, responsabili dell'interazione con cationi bivalenti essenziali per la funzione del recettore. La subunità  $\beta$  è caratterizzata, invece, dalla presenza di quattro segmenti ricchi in cisteina che stabilizzano l'esteso "loop" extracellulare ammino-terminale. Le due subunità associandosi, costituiscono una tasca in corrispondenza della quale avviene il riconoscimento e il legame delle molecole specifiche per ciascuna integrina (Fig.4).



**FIG.4. Struttura di un recettore integrinico**

Negli ultimi anni si è visto che le integrine non sono coinvolte solo nell'adesione cellulare, ma anche nei meccanismi di trasduzione di segnali dall'esterno verso l'interno delle cellule e viceversa.

Esistono due vie di segnali mediate dalle integrine: la prima è una via diretta in cui queste molecole, in seguito all'interazione con i componenti della matrice extracellulare, attivano una serie di segnali intracellulari; la seconda, invece, è una via indiretta in quanto le integrine modulano segnali mitogeni di vari fattori di crescita o sono coinvolte nel processo dell'apoptosi.

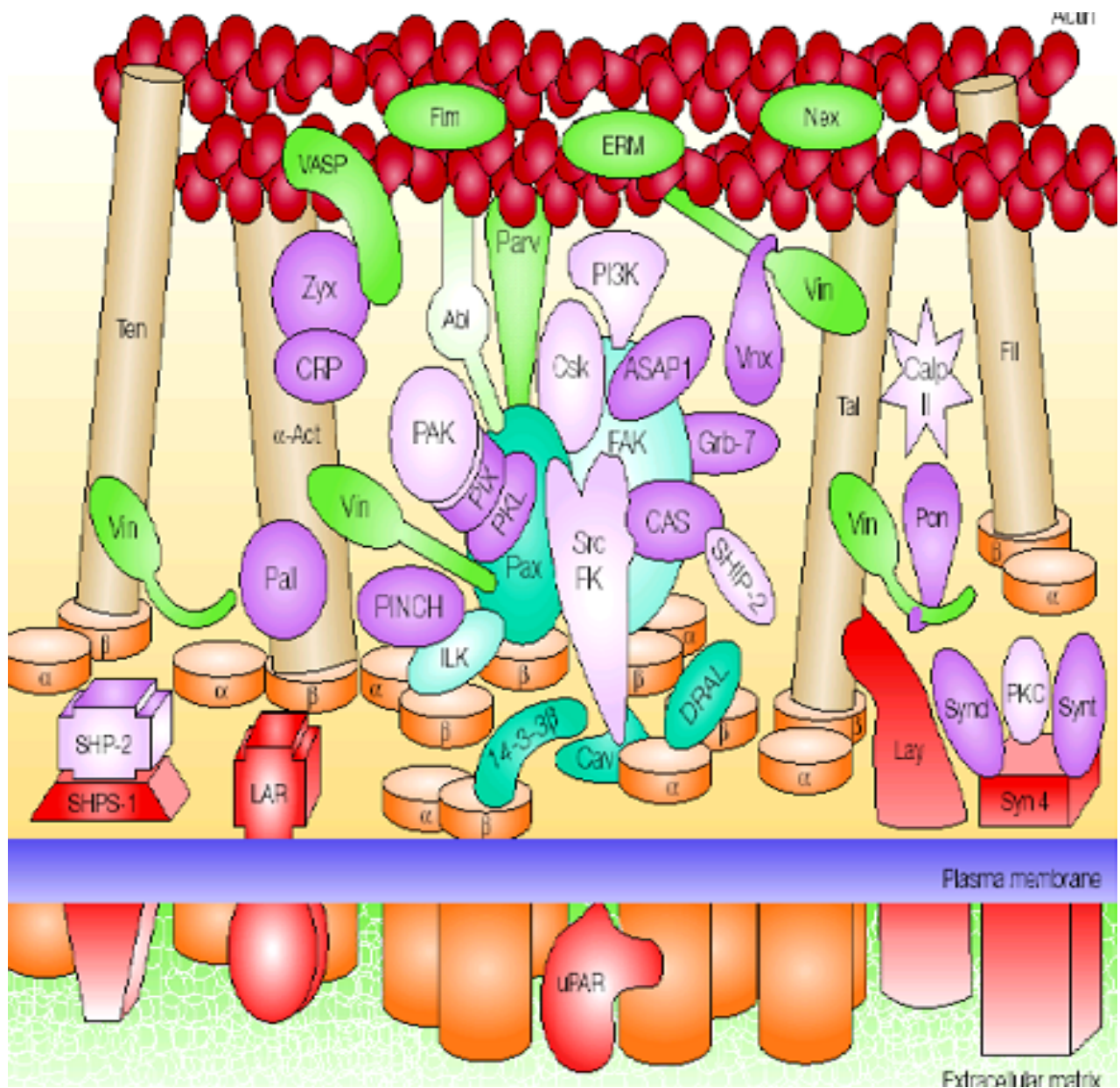
I segnali integrinici e l'assemblaggio del citoscheletro sono intimamente connessi. Mentre i domini extracellulari delle due subunità integriniche legano i componenti della matrice extracellulare determinando il "clustering" delle integrine sulla superficie della membrana, i domini citoplasmatici, che non hanno un'attività enzimatica intrinseca, agiscono legandosi con proteine citoplasmatiche, formando così da ambo i lati della membrana cellulare grandi complessi proteici costituiti da proteine della matrice extracellulare, integrine e molecole citoscheletriche note come "placche di adesione" o "adesioni focali" (Fig.5).

Le placche di adesione hanno un ruolo di primaria importanza nella regolazione della struttura del citoscheletro cellulare. Prima che il loro coinvolgimento nella trasduzione dei segnali diventi predominante, la principale funzione di queste formazioni è quella di collegare la cellula al suo substrato attraverso le integrine che, mediante tali strutture, si associano al citoscheletro actinico.

Le placche di adesione sono costituite da diversi tipi di proteine: la vinculina (130 kDa) è la prima componente di queste strutture ritenuta responsabile del legame dei filamenti actinici alla membrana cellulare (60). Essa lega, a sua volta, la proteina di 215 kDa talina, quella di 100 kDa  $\alpha$ -actinina e la paxillina. La proteina di 200 kDa tensina è un'altra fra i maggiori costituenti delle placche di adesione che lega e forma legami crociati con i filamenti actinici; essa è fondamentale per la formazione delle fibre di "stress".

Nelle placche di adesione si localizzano altre proteine ad attività funzionale, quali chinasi ( $p125^{FAK}$ ,  $p60^{Src}$ ), fosfatasi (LAR) o proteasi (calpaina II).





*Nat Rev Mol Cell Biol.*2001, 2:795

**FIG.5. Placca di adesione focale**

p125<sup>FAK</sup>, in seguito al “clustering” integrinico e alla polimerizzazione dell’actina, si autofosforila a livello della tirosina 397. Sebbene l’esatto modo con cui p125<sup>FAK</sup> estrinsechi la propria funzione nelle placche di adesione non sia ancora completamente chiarito, proteine quali la paxillina e p130<sup>CAS</sup> sono considerate bersagli per la trans-fosforilazione di questa proteina. E’ stato dimostrato che un aumento della fosforilazione di p125<sup>FAK</sup> si associa in genere ad un aumento della fosforilazione della paxillina. Affinchè ciò avvenga è necessaria l’autofosforilazione della Tyr-397 che lega il dominio SH2 di p60<sup>Src</sup>. E’ possibile che la fosforilazione di paxillina sia mediata in parte dall’attività del complesso p125<sup>FAK</sup>-p60<sup>Src</sup>. Evidenze sperimentali dimostrano che in seguito ad un aumento della fosforilazione di p125<sup>FAK</sup> si verifica anche un incremento della fosforilazione di p130<sup>CAS</sup> e che quest’ultimo fenomeno è mediato dall’azione del complesso p125<sup>FAK</sup>-p60<sup>Src</sup> (62).

La paxillina è stata individuata per la prima volta quale substrato di p60<sup>Src</sup> durante esperimenti rivolti ad individuare tutte le molecole associate a quest’ultima molecola; successivamente è stata caratterizzata come una proteina delle placche di adesione, espressa in diversi tipi cellulari, poco presente nelle piastrine e nei diversi tipi di cellule del sistema nervoso centrale, ma abbondante nelle cellule epiteliali (63).

Metodiche elettroforetiche hanno consentito l’identificazione della paxillina con una banda corrispondente ad una proteina di circa 68 kDa, ma sono state individuate altre due isoforme che hanno un peso molecolare di 44 e 46 kDa. Essa contiene diversi domini funzionali che utilizza per le sue interazioni sia con altre proteine, sia con il citoscheletro actinico per la sua localizzazione nelle placche di adesione. Questa proteina, oltre a legarsi con le diverse componenti delle placche di adesione, permette la localizzazione della fosfatasi PTP-Pest in queste strutture. Tale fosfatasi è in grado di defosforilare p130<sup>CAS</sup> e di rompere il complesso p130<sup>CAS</sup>-Crk. (64).

La paxillina può essere fosforilata da diverse chinasi a livello dei residui di tirosina, serina e treonina. Le principali molecole che estrinsecano questa azione sono p125<sup>FAK</sup>, p60<sup>Src</sup> e il complesso p210<sup>BCR/ABL</sup> (65). La sua fosforilazione è coinvolta nella regolazione della formazione delle placche di adesione e, quindi, dell’adesione cellulare (66), nonchè sembra essere cruciale per la trasduzione dei segnali integrinici. Un’ulteriore evidenza è stata fornita dalla dimostrazione che la proteina lega direttamente i domini intracellulari dell’integrina  $\alpha_4$  (67).

Sebbene le citochine ed i recettori dei fattori di crescita non siano localizzati nelle placche di adesione, si è osservato un aumento della fosforilazione in tirosina della paxillina a seguito dell'attivazione di tali tipi di recettori cellulari. L'attivazione dell'IGF-1, per esempio, induce la fosforilazione di paxillina e p125<sup>FAK</sup> nelle cellule 3T3 (68), come anche la stimolazione del recettore degli estrogeni è responsabile della fosforilazione della paxillina nel tumore mammario umano (69).

Le integrine in cooperazione con i recettori dei fattori di crescita modulano le vie del segnale dall'esterno verso l'interno delle cellule e viceversa, svolgendo in tal modo un ruolo fondamentale per la sopravvivenza e la cooperazione tra le cellule dei diversi tessuti, organi e apparati dell'organismo.

Queste proteine sono altamente regolate e la localizzazione di un patogeno sulla superficie delle cellule ospiti o nel fagosoma dipende sia dallo stato di attivazione della cellula ospite, sia dal numero di recettori presenti al livello della membrana cellulare disponibili per il contatto con il batterio.

Il legame tra i batteri ed i recettori integrinici induce la stimolazione di diverse vie di trasduzione di segnali all'interno delle cellule che includono sia riarrangiamenti citoscheletrici che stabilizzano le interazioni cellula-batterio, che l'induzione di specifici trascritti cellulari che portano a conseguenze per il processo infettivo che vanno ben oltre gli effetti localizzati al sito di adesione (58).

Diversi studi hanno dimostrato che patogeni intracellulari, quali *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis* e *Leishmania donovani*, promuovono la loro internalizzazione nei macrofagi mediante l'interazione con il recettore integrinico CR3 ( $\alpha_M\beta_2$ ) (70, 71, 72).

*Staphylococcus aureus* esprime, invece, due proteine leganti la fibronectina, FnbpA e FnbpB, che legano direttamente l'integrina  $\alpha_5\beta_1$  promuovendo l'internalizzazione batterica nelle cellule eucariotiche (73) e reclutando, a livello del sito di adesione batterica, le proteine associate alle placche di adesione focale, vinculina, tensina e pp125<sup>FAK</sup> (74).

I batteri enteroinvasivi *Yersinia enterocolitica* e *pseudotuberculosis* richiedono per la loro internalizzazione, il legame delle invasine batteriche con cinque membri ( $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ , e  $\alpha_v\beta_1$ ) della

famiglia dei recettori integrinici (75). L'interazione dell'invasina con l'integrina  $\alpha_5\beta_1$  gioca un ruolo importante nell'internalizzazione di *Yersinia enterocolitica* in cellule HeLa adese a fibronectina, e in questo contesto un ruolo chiave sembra essere svolto da pp125<sup>FAK</sup> (76).

Studi precedenti hanno, infatti, dimostrato che un'elevata efficienza di penetrazione di *Yersinia pseudotuberculosis* in cellule non-fagocitiche richiede un'elevata affinità di legame tra l'invasina e la catena  $\beta_1$  dei recettori integrinici, e necessita dell'attività tirosin chinasi di pp125<sup>FAK</sup> e di *c-Src* (77).

Il meccanismo d'azione è ancora da chiarire; si ipotizza il reclutamento di pp125<sup>FAK</sup> a livello del sito di legame tra invasina e integrina o l'attivazione di pp125<sup>FAK</sup> successiva a quest'interazione; in ogni caso quest'evento porterebbe ad una cascata di segnali che culminerebbero con l'aumento della capacità fagocitica delle cellule, e quindi, ad un incremento dell'internalizzazione batterica (77).

Il processo di infezione della *Listeria monocytogenes* rappresenta, invece, un importante strumento per lo studio delle associazioni funzionali tra i recettori cellulari.

E' stato osservato che in cellule di carcinoma mammario esiste un'associazione fisica del recettore Met e l'integrina  $\alpha_6\beta_4$ , che si associano a livello della membrana delle cellule tumorali formando un complesso unico. Il potere invasivo di tali cellule tumorali stimulate con l'HGF si annulla in seguito al blocco dell'integrina  $\alpha_6\beta_4$  (78, 79). Successivamente è stata scoperta l'esistenza di una diretta interazione del recettore di crescita epatocitario, Met con pp125<sup>FAK</sup>, evento che conferisce un potere invasivo alle cellule tumorali (80).

Studi più approfonditi sono necessari per chiarire le connessioni esistenti tra le integrine e il recettore Met coinvolto nell'interazione tra la *Listeria* e le cellule ospiti e i diversi processi di trasduzione di segnali che trasmettono le informazioni dai recettori integrinici alle molecole coinvolte nell'attività del citoscheletro e nell'interscambio a livello delle membrane cellulari.

Negli ultimi anni un notevole contributo al chiarimento delle funzioni integriniche è stato dato dalla scoperta nel veleno di varie specie di vipere (*Crotalidae* e *Viperidae*) di una classe di antagonisti integrinici polipeptidici denominati disintegrine (81).

Le disintegrine sono proteine a basso peso molecolare (40-100 amminoacidi) ricche in cisteine, inizialmente descritte quali potenti inibitori del recettore per il fibrinogeno presente sulla superficie delle piastrine, l'integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Esse sono rilasciate nel veleno in seguito all'attività proteolitica delle metallo-proteinasi PII e PIII (82).

Le disintegrine in base alla loro lunghezza e al numero di ponti disolfuro sono state suddivise in 5 differenti gruppi (Fig.6).

Il primo gruppo comprende piccole disintegrine (echistatina, eristocofina, eristostatina, ocellatusina) composte di 49-51 residui e 4 ponti disolfuro.

Il secondo gruppo è formato da disintegrine di media lunghezza contenenti circa 70 residui amminoacidici e 6 ponti disolfuro; sono state caratterizzate più di 60 disintegrine appartenenti a questo gruppo, tra cui la trigramina, la kistrina, la flavoridina, l'albolabrina e la barburina.

Del terzo gruppo fa parte la lunga disintegrina bitistatina di 84 residui amminoacidici legati da 7 ponti disolfuri e la salmosina 3.

Al quarto gruppo appartengono, invece, le disintegrine PIII-SVMPs di circa 100 amminoacidi con 16 residui cisteinici coinvolti nella formazione di 8 ponti disolfuro (82).

Diversamente dalle piccole, medie e lunghe disintegrine che sono molecole a singola catena, il quinto gruppo è composto sia da omodimeri che eterodimeri. Le disintegrine dimeriche come la contortrostatina, EC3 e EMF-10, contengono subunità di circa 67 residui con 10 cisteine che formano 4 legami disolfuro intra-catena e 2 legami cisteinici intercatena.(82)

La maggior parte delle disintegrine contengono la sequenza Arg-Gly-Asp (RGD) che rappresenta un comune sito di legame per le integrine (83), ma, a causa di vari fattori strutturali, quali le sequenze degli amminoacidi che fiancheggiano la sequenza RGD, la posizione dei ponti disolfuro presenti nella molecola e la regione della molecola oltre il "loop" contenente l'RGD, le disintegrine mostrano una selettività di interazione con le diverse integrine (84).

Altre sequenze possono essere responsabili dell'attività biologica delle disintegrine. L'atrolisina, ad esempio, contiene la sequenza Met-Leu-Asp (MVD), la barburina contiene la sequenza Lys-Gly-Asp (KGD) (12), le disintegrine EC3 e EMF10 contengono le sequenze MLD e VGD (85, 86, 87).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>PICCOLE</b>									
Echistatina							ECESGPCCRNCKFLKEGTICKRARGD	-DMDDYCNGKTCDCPRNPHKGPAT	
Eristostatina							QWWPCATGPCCRRCKFKRAGKVCVRVARGD	-WNDDYCTGKSCDCPRNPWNG	
<b>MEDIE</b>									
Atrolisina							ECDCGSLEN---PCCYATTCKMRPGSQCAEGLCCDQCRFMKKGTVCRVSMVD	-RNDDTCTGQSADCPRNGLY	
Barburina							EAGEECDCSSPEN---PCCDAATCKLRPGAQCADGLCCDQCRFMKKGTVCRVAKGD	-WNDDRCTGQSADCPGLYG	
Flavoridina							GEECDGSPSN---PCCDAATCKLRPGAQCADGLCCDQGRFKKKTGICRIARGD	-FPDDRCTGLSMDCPRWNDL	
Kistrina							GKECDCSPEM---PCCDDATCKLRPGAQCGEGLCCEQCKFSRAGKICRIPRGD	-MPDDRCTGQSADCPRYH	
Trigramina							EAGEDCDCGSPAN---PCCDAATCKLIPGAQCGEGLCCDQCSFIEEGTVCRIARGD	-DLDDYCNGRSAGCPRNPFH	
<b>LUNGHE</b>									
Bitistatina	PVCGNKILEQGEDCDCGSPAN	QDQCCNAATCKLTPGSQCNHGE	CGDQCKFKKARTVCRIARGD	-WNDDYCTGKSSDCPWNH					
<b>PIII</b>									
Giararacina		EAGEECDGPPGN---	PCCDAATCKLRPGAQCAEGLCCDQCRFKGAGKICRRARGD	-NPDDRCTGQSADCPNRNRFHA					
<b>DIMERICHE</b>									
EC3A			NSV---	HPCCDPVKCEPREGEHCISGPCCRN	NCYFLRAGTVCKRAVGD	-DVDDYCSGITPDCPRNRYK-			

**FIG.6. Le disintegrine.** I membri rappresentativi di ciascuna delle cinque sottofamiglie delle disintegrine mostrano un differente sito di legame per le integrine.

Le disintegrine oltre ad essere potenti inibitori dell'aggregazione piastrinica mediante il loro legame all'integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , sono in grado di legare diversi recettori integrinici presenti sulla superficie dei fibroblasti, degli osteoclasti e delle cellule di melanoma, inibendo il legame di tali cellule con i componenti della matrice extracellulare (88). Il vantaggio delle disintegrine nel prevenire in vivo l'aggregazione piastrinica risiede nella loro breve emivita e nell'assenza di tossicità. (89).

La flavoridina è una disintegrina monomerica di 70 residui amminoacidici contenente 12 cisteine legate da 6 ponti disolfuro, isolata dal veleno di vipera *Trimeresurus flavoviridis*. La flavoridina è molto efficiente nel provocare il distacco delle cellule HeLa adese alla fibronectina, presentando un'elevata affinità per l'integrina

$\alpha_5\beta_1$ . L'analisi NMR ha rivelato che il C-terminale della flavoridina agisce come un sito di legame secondario per la specifica interazione con il recettore  $\alpha_5\beta_1$  spiegando così la sua elevata attività nel promuovere il distacco delle cellule dalla matrice extracellulare (90).

Studi precedenti hanno dimostrato l'efficienza della flavoridina nell'inibire l'internalizzazione di *Yersinia enterocolitica* nelle cellule HeLa adese a fibronectina, e il ruolo importante che il recettore  $\alpha_5\beta_1$  sembra giocare nell'invasione batterica.

La flavoridina legandosi all' $\alpha_5\beta_1$  previene la distruzione del complesso funzionale FAK-Cas coinvolto nell'ingresso del batterio nella cellula e blocca l'attivazione dei segnali cellulari responsabili del disassemblaggio delle adesioni focali, evento richiesto per l'internalizzazione di *Yersinia enterocolitica* nelle cellule ospiti.(76).

L'echistatina è una disintegrina isolata dal veleno di vipera *Echis carinatus* ed è una proteina a singola catena costituita da 48 amminoacidi, che includono 8 cisteine. Questa disintegrina inibisce l'adesione delle cellule di melanoma murino B16-BL6 alle proteine della matrice extracellulare ed è capace di provocare il distacco delle cellule adese alla fibronectina (91). Il trattamento con echistatina causa una riduzione dose- dipendente dei livelli di fosforilazione della proteina citoplasmatica pp125<sup>FAK</sup>, influenzando così il legame pp125<sup>FAK</sup>-Src e la fosforilazione della proteina citoscheletrica paxillina (92). Nelle piastrine adese al fibrinogeno l'echistatina causa una riduzione della fosforilazione di pp72<sup>syk</sup> e pp125<sup>FAK</sup>( 93).

L'echistatina inibisce l'adesione delle cellule di carcinoma di Lewis (3LL) alla fibronectina e alla laminina immobilizzata ed inibisce, inoltre, la formazione di metastasi in vivo in topi trattati con cellule 3LL (94).

La kistrina è una disintegrina di 68 amminoacidi isolata dal veleno di *Agkistrodon rhodostoma*, contenente la tipica sequenza di riconoscimento RGD. Come l'echistatina e la flavoridina, la kistrina lega con alta affinità l'integrina  $\alpha_v\beta_3$  immobilizzata nei saggi in fase solida, mentre mostra bassa affinità per l'integrina  $\alpha_5\beta_1$  esercitando una scarsa capacità di promuovere il distacco cellulare e una bassa efficienza nell'inibire l'adesione alla fibronectina delle cellule di melanoma B16-BL6 (95). Similmente all'echistatina è capace di inibire il riassorbimento osseo, interferendo con l'attività RGD-dipendente degli osteoclasti (96).

L'importanza della kistrina come agente antitrombotico è stata, invece, dimostrata mediante l'utilizzo di modelli sperimentali in vivo delle trombosi (97). Questa disintegrina oltre ad accelerare i fenomeni di trombolisi è capace di prevenire la riocclusione in vivo delle coronarie e potrebbe essere impiegata come coadiuvante trombolitico nel trattamento di pazienti affetti da infarto acuto del miocardio.(98)

Attualmente è in fase sperimentale l'impiego delle disintegrine come antiaggreganti piastrinici, come antinfiammatori e come farmaci per la terapia dei tumori. Esse rappresentano un utile strumento per lo studio della patogenesi batterica.



## 2-SCOPO E ARTICOLAZIONE DEL LAVORO DI TESI

Il lavoro di tesi è stato rivolto al chiarimento di alcuni aspetti del meccanismo molecolare con cui *Listeria monocytogenes* penetra in cellule non fagocitiche.

A tal fine la ricerca si è articolata in diverse fasi con l'obiettivo innanzitutto di caratterizzare il ruolo svolto dalle integrine nel processo di internalizzazione della *Listeria monocytogenes*.

In particolare, sono stati dapprima effettuati saggi di adesione e invasione batterica di ceppi di *Listeria monocytogenes* wild type e ceppi mutanti per l'internalina A e B, in diverse condizioni sperimentali, variando cioè il numero di cellule, la concentrazione batterica e i tempi di infezione.

Per individuare la classe di integrine eventualmente coinvolta nel processo di invasione batterica sono stati realizzati saggi di inibizione dell' "uptake" batterico impiegando anticorpi monoclonali e policlonali diretti contro specifiche subunità integriniche. Sono state, inoltre, utilizzate tre diverse disintegrine (echistatina, flavoridina e kistrina), antagonisti integrinici con diversa affinità per specifici recettori integrinici, a dosi non citotossiche.

Lo studio è stato, quindi, rivolto alla caratterizzazione della fitta e complessa rete di connessioni esistenti tra le integrine e il recettore cellulare, c-Met, implicato nell'internalizzazione mediata dall'InlB, con particolare riferimento alle vie di trasduzione del segnale attivate in seguito all'interazione InlB-Met.

Sono stati studiati i profili di fosforilazione delle proteine citosoliche di segnale pp125<sup>FAK</sup> e paxillina, proteine che giocano un ruolo cruciale nei processi di adesione cellulare, nella migrazione cellulare, nella formazione della capsula fagocitica e nel traffico di membrana.

Lo studio dei processi alla base dell'interazione della *Listeria monocytogenes* con le cellule ospiti rappresenta un utile strumento per il chiarimento innanzitutto dei meccanismi molecolari responsabili della patogenicità della *Listeria*, ma anche per la delucidazione delle funzioni integriniche non solo nell'ambito delle infezioni batteriche, ma in tutte quelle patologie in cui è richiesta una modulazione della funzionalità integrinica.

I risultati ottenuti possono contribuire non solo all'identificazione di bersagli molecolari diagnostici e terapeutici per le infezioni da *Listeria* nell'uomo e negli animali, ma anche all'avanzamento delle conoscenze

sulle associazioni funzionali tra i recettori cellulari e sul ruolo che tali recettori possono avere nell'ambito della biologia dell'invasione tumorale.

### 3-MATERIALI E METODI

#### 3.1. Reagenti

Il mezzo di coltura DMEM, l' protinina, la leupeptina, l'echistatina, la kistrina, la flavoridina, l'albumina serica bovina (BSA), l'ortovanadato e la fibronectina sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich; la glutammina e la tripsina da ICN Biomedicals (Aurora, OH,USA); il siero fetale bovino (FBS) da Hypoclone Laboratories (Logan, UT, USA).

Il latte disidratato in polvere è stato fornito dalla ditta Biorad, l'acido etilen-diammino-tetracetico (EDTA) dalla Applichem (Napoli, Italia); il Tween-20 dalla ditta Pharmacia Biotech. (Uppsala, Svezia). La membrana di nitrocellulosa Protran è stata fornita dalla ditta Schlecker & Schnell (Keen, NH, U.S.A). Le lastre di sviluppo ed i reagenti ECL sono stati forniti dalla ditta Amersham Corp. (Little Chalfont, UK).

#### 3.2. Anticorpi

L'anticorpo policlonale anti-Met (C-12) sc-10, proteina A-agarose e proteina G-agarose sono stati forniti dalla Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz,CA,USA). L'anticorpo monoclonale anti-fosfotirosina (PT66) IgG, gli anticorpi secondari goat-anti-mouse IgG e goat anti-rabbit IgG coniugati alla perossidasi sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.), l'anti-pp125<sup>FAK</sup> (rabbit policlonal IgG) dall'Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA), l'anti-paxillina IgG dalla Transduction Laboratories (Lexington, KY, U.S.A.), gli anticorpi monoclonali anti-integrine  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  dalla Chemicon International, Inc.(Chemicon, CA,USA).

### 3.3. Colture cellulari e batteriche

Le linee cellulari utilizzate comprendono: cellule renali di scimmia Vero (ATCC BS CL 86), fornite dall'Unità Operativa di Virologia dell'Istituto Zooprofilattico per il Mezzogiorno (IZSM, Portici, NA), e cellule epiteliali umane HeLa.

Le cellule sono state conservate in azoto liquido e per lo scongelamento sono state poste in bagno termostato a 37°C per 3-4 min. Le cellule scongelate sono state trasferite in un tubo contenente DMEM e sottoposte a centrifugazione a 800xg per 10 min per allontanare il DMSO. Dopo centrifugazione, il pellet è stato risospeso in 10 ml di DMEM contenente 10% di FBS, 1% di L-glutamina, 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomycin e trasferito in piastra Petri di 10 cm di diametro in incubatore a CO<sub>2</sub> a 37°C.

Per la propagazione e per i saggi di adesione e invasione batterica le cellule sono state staccate con 0.25% tripsina/0.02% EDTA in tampone fosfato (PBS), pH 7.2; lavate con DMEM e risospese in DMEM completo per la propagazione o in DMEM privo di antibiotico per i saggi di uptake.

I ceppi di *Listeria monocytogenes* wild type (ATCC 7644), mutante A76 ( $\Delta$ InlB) e mutante WL-111 ( $\Delta$ InlA) sono cresciuti per 24 h a 37°C in “brain-heart infusion” (BHI) brodo (Difco). Per gli esperimenti di infezione, le colture sono state diluite in brodo BHI, incubate per altre 3 h a 37°C fino alla crescita logaritmica, raccolte mediante centrifugazione a 7000 rpm per 5 min e lavate con PBS prima dell'uso. La concentrazione batterica è stata misurata spettrofotometricamente (OD<sub>600</sub>), e contemporaneamente è stata confermata mediante conta delle colonie (CFU/ml) in seguito a piastramento su BHI agar di diluizioni seriali delle sospensioni batteriche.

### 3.4. Saggi di adesione e invasione batterica

La capacità di adesione e di invasione batterica è stata valutata su monostrato di cellule Vero e HeLa , risospese in DMEM con FBS in piastre a 24 pozzetti e incubate per una notte a 37°C. Il giorno dell'esperimento i monostrati cellulari confluenti sono stati lavati con DMEM privo di FBS e antibiotico e infettati con i batteri a diverse molteplicità di infezione (MOI: 1, 3 ,5 ,10 ,15 , 20) per 1 h a 37°C in agitazione. L'adesione dei batteri ai monostrati cellulari è stata favorita mediante centrifugazione a 2500 rpm per 5 minuti.

Per i saggi di inibizione dell' "uptake", prima dell'infezione le cellule sono state incubate per 15 min in presenza di diverse concentrazioni di anticorpi (0.5-1000 µg/ml) o di disintegrine (0.05-1µg/ml) diluite in DMEM privo di FBS e di antibiotico.

Per quantizzare i batteri intracellulari, i monostrati cellulari sono stati lavati due volte con PBS e incubati per 2 h in DMEM contenente gentamicina (CN) alla concentrazione di 100 µg/ml. Successivamente, le cellule lavate due volte con PBS sono state lisate per 5 min con 1 ml di 0.3% Triton X-100 in acqua deionizzata sterile. Il numero di batteri intracellulari è stato determinato mediante piastramento su BHI agar di appropriate diluizioni seriali dei lisati cellulari.

Per i test di adesione le cellule Vero e HeLa sono state infettate come descritto precedentemente, i monostrati sono stati lavati cinque volte con PBS e lisati con 0.3% Triton X-100 e le appropriate diluizioni sono state piastrate su BHI agar. Il numero di batteri adesi è stato ricavato sottraendo al numero di batteri totali, ottenuti in assenza di CN , il numero di batteri intracellulari , ottenuti trattando con gentamicina.

### 3.5. Test di adesione

L'adesione dei ceppi di *Listeria monocytogenes* alle cellule Vero e alle cellule HeLa è stata saggiata secondo il metodo di Cravioto et al. con alcune modifiche (99).

I ceppi batterici sono cresciuti in brodo BHI con agitazione costante (240 rpm) a 37°C per una notte. Prima del saggio, le colture batteriche sono state risospese in appropriato mezzo di adesione (DMEM contenente 1% di D-mannosio), e sono state inoculate ad una MOI di 100:1 sui monostrati semiconfluenti delle cellule Vero e HeLa cresciute su piastre a sei pozzetti in DMEM a 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. I batteri e le cellule sono stati incubati a 37°C per 3 e 6 h e lavati tre volte con PBS 10 mM. I monostrati sono stati fissati con metanolo per 10 minuti a temperatura ambiente e colorati con cristallo violetto, diluito 1:10 in PBS, per 10 min. Per rimuovere l'eccesso di colorante i pozzetti sono stati lavati abbondantemente con acqua sterile ed esaminati al microscopio Zeiss Axiovert 25 (ingrandimento x 400).

### **3.6. Preparazione dei lisati cellulari, immunoprecipitazione, Western blotting**

Le cellule Vero e le cellule HeLa ( $1 \times 10^6$ ) sono state piastrate su piastre da 3.5 cm di diametro (Costar) ricoperte con fibronectina (10 µg/ml), e lasciate aderire a 37°C per 3 h. Prima dell'infezione, le cellule sono state lavate due volte con PBS e il mezzo rimpiazzato con DMEM privo di antibiotico. Le cellule sono state infettate per 1 h con una MOI pari a 3. Dopo l'infezione, le cellule lavate con PBS sono state trattate con l'antibiotico CN per 2 h a temperatura ambiente. Trascorse le 2 ore, le cellule sono state lisate in tampone RIPA (Tris/NaCl/Pi contenente 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,5% acido deossicolico, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptina, 0.1 U/ml aprotinina.) per 30 min su ghiaccio. I lisati sono stati chiarificati mediante centrifugazione a 14000 rpm per 10 min a 4°C e il surnatante raccolto e conservato a -20°C.

La quantità di proteine presenti nei campioni è stata determinata mediante Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories).

Per gli esperimenti di immunoprecipitazione, i lisati contenenti la stessa quantità di proteine sono stati incubati con proteina A-agarose (per pp125<sup>FAK</sup>) o proteina G-agarose (per Met e paxillina) per 2 h a 4°C in

agitazione su ruota. Dopo l'incubazione, i lisati sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 min a 4°C e il surnatante raccolto è stato incubato con un anticorpo specifico anti-Met (1µg/100µg di proteine), anti-pp125<sup>FAK</sup> (1µg/100µg di proteine), o con anti-paxillina (1µg/100µg di proteine) per 3 h a 4°C su ruota.

Proteina A- agarose o proteina G- agarose sono state aggiunte ai campioni e incubati per una notte a 4°C su ruota. Gli immunocomplessi sono stati lavati con il tampone di lisi e le proteine, solubilizzate in Laemmli buffer e bollite per 5 min, fatte correre su gel di poliacrilammide.

Dopo l'elettroforesi, i campioni sono stati trasferiti su nitrocellulosa mediante un apparato Mini Trans-Blot (Bio- Rad Laboratories), i filtri saturati per 1 h a 42°C in Tris/NaCl/Pi contenente 5% di BSA e lavati con Tris/NaCl/Pi/Tween (TBS-T: 150 mM NaCl, 20 mM TrisHCl, pH=7,4, 0,3% Tween 20).

Per valutare la fosforilazione delle proteine i filtri sono stati incubati per tutta la notte con anticorpo anti-PT66 diluito 1: 10000 in Tris/NaCl/Pi, 1% BSA. I blots sono stati lavati per tre volte con TBS-T 0,3%, incubati per 2 h con anticorpo secondario coniugato alla perossidasi diluito 1:3000 in 1% BSA-TBS-T, e lavati per tre volte con TBS-T. Le proteine sono state visualizzate mediante ECL chemiluminescent kit (Amersham).

Gli stessi blots sono stati “strippati” e risaggiati usando o l'anticorpo anti-Met, o l'anti- pp125<sup>FAK</sup> o l'anti-paxillina per verificare che la stessa quantità di proteina era stata immunoprecipitata dai campioni.

## 4-RISULTATI

### 4.1. L'effetto della MOI sull' "uptake" batterico

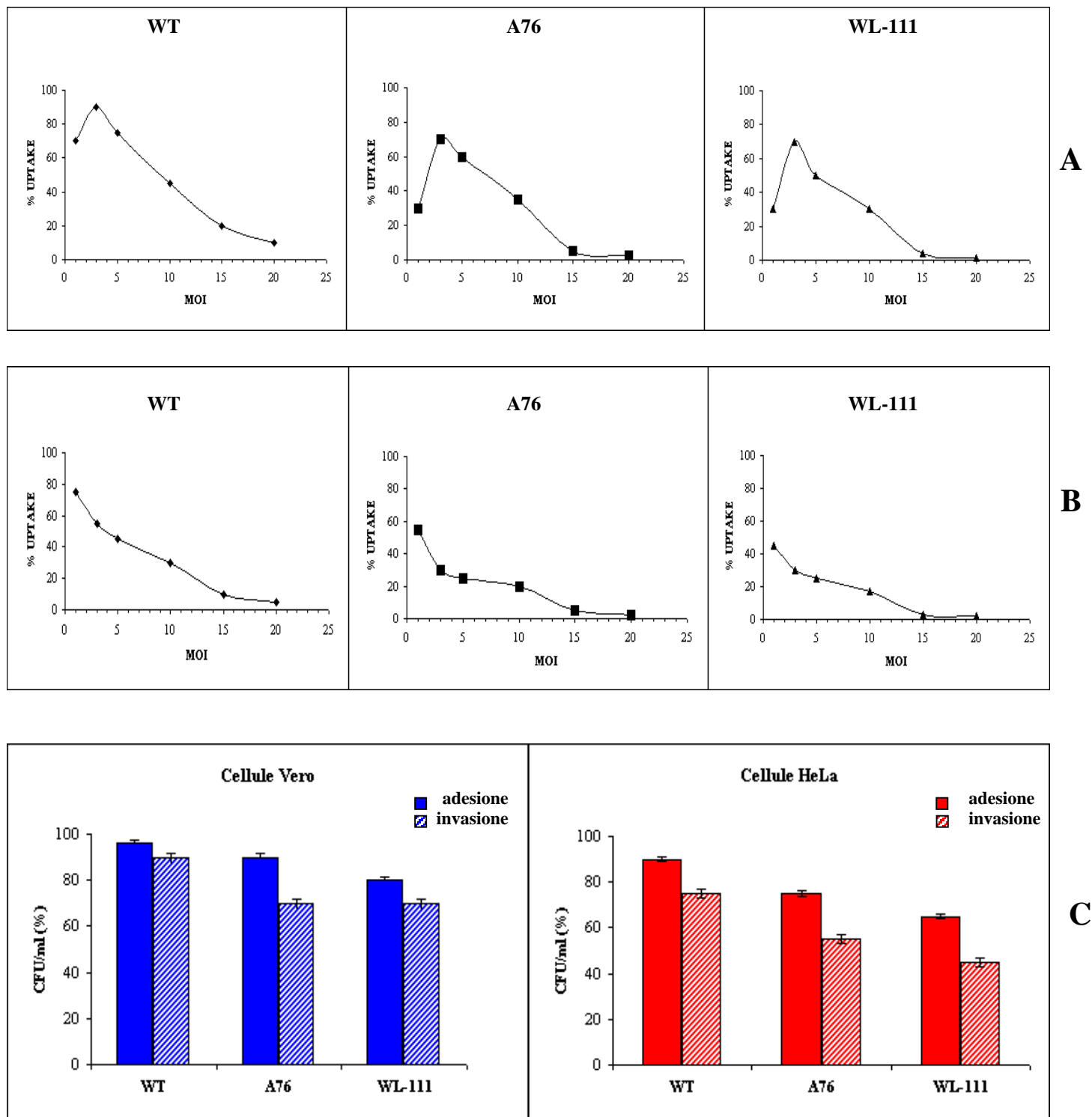
I batteri sono stati recuperati dalle colture cellulari infettate e la percentuale di "uptake" batterico (numero di batteri internalizzati/numero di batteri inoculati) e la molteplicità di infezione (MOI: numero di batteri inoculati/numero di cellule) è stata calcolata per comparare la capacità di invasione dei diversi ceppi batterici.

L' "uptake" di *Listeria monocytogenes* nelle cellule Vero dipende sia dal numero di batteri utilizzati per l'infezione, sia dal numero di cellule infettate, sia dalla durata dell'infezione; l' "uptake" varia anche in funzione del ceppo batterico utilizzato. L'aggiunta di  $1 \times 10^6$  batteri a  $3 \times 10^5$  cellule Vero ha prodotto circa il 90% di "uptake" batterico per il ceppo wild type e il 70% di "uptake" per i due ceppi mutanti. Quando l' "uptake" è stato studiato in funzione del tempo, il massimo effetto è stato osservato dopo 1 h di esposizione delle cellule ai batteri ( Fig.7 A).

Variando, invece, il sistema cellulare, utilizzando cioè le cellule HeLa, la migliore percentuale di "uptake" è stata ottenuta infettando  $5 \times 10^5$  cellule con un altrettanto numero di batteri (MOI= 1) per 1 h. Il ceppo parentale anche qui ha mostrato una maggiore capacità invasiva rispetto ai mutanti (70% WT; 50% A76; 55% WL-111) (Fig.7 B). L'assenza della fase di centrifugazione a 2500 rpm per 5 min in questo caso riduce di gran lunga il recupero batterico (dati non riportati).

I risultati ottenuti utilizzando un numero variabile di batteri con un numero fisso di cellule hanno dimostrato, in entrambi i sistemi cellulari, che l'aumento della MOI induce una riduzione dell' "uptake" batterico per tutti e tre i ceppi (Fig. 7A-B).





**FIG.7. Adesione e invasione di *Listeria monocytogenes* in cellule Vero e HeLa.**

L'aumento del MOI (1, 3, 5, 10, 15, 20) induce una riduzione dell'uptake batterico di *Listeria monocytogenes* wild-type (♦), mutante A76 (■) e mutante WL-111(▲) nelle cellule Vero (A) e nelle cellule HeLa (B).

I tre ceppi di *L. monocytogenes* presentano una capacità di adesione maggiore di quella invasiva sia alle cellule Vero che alle cellule HeLa (C). Il numero di batteri adesi è stato determinato sottraendo al numero di batteri totali ottenuti in assenza di gentamicina (CN), il numero di batteri intracellulari (CFU/ml) ottenuti 41 trattando con gentamicina.

## 4.2. L' "uptake" batterico dipende dalla capacità di adesione della *Listeria*

La patogenicità della *Listeria monocytogenes* è fortemente dipendente dalla sua capacità di invadere, sopravvivere e moltiplicarsi all'interno delle cellule ospiti, ma un requisito fondamentale che deve avere è la capacità di adesione alle cellule ospiti.

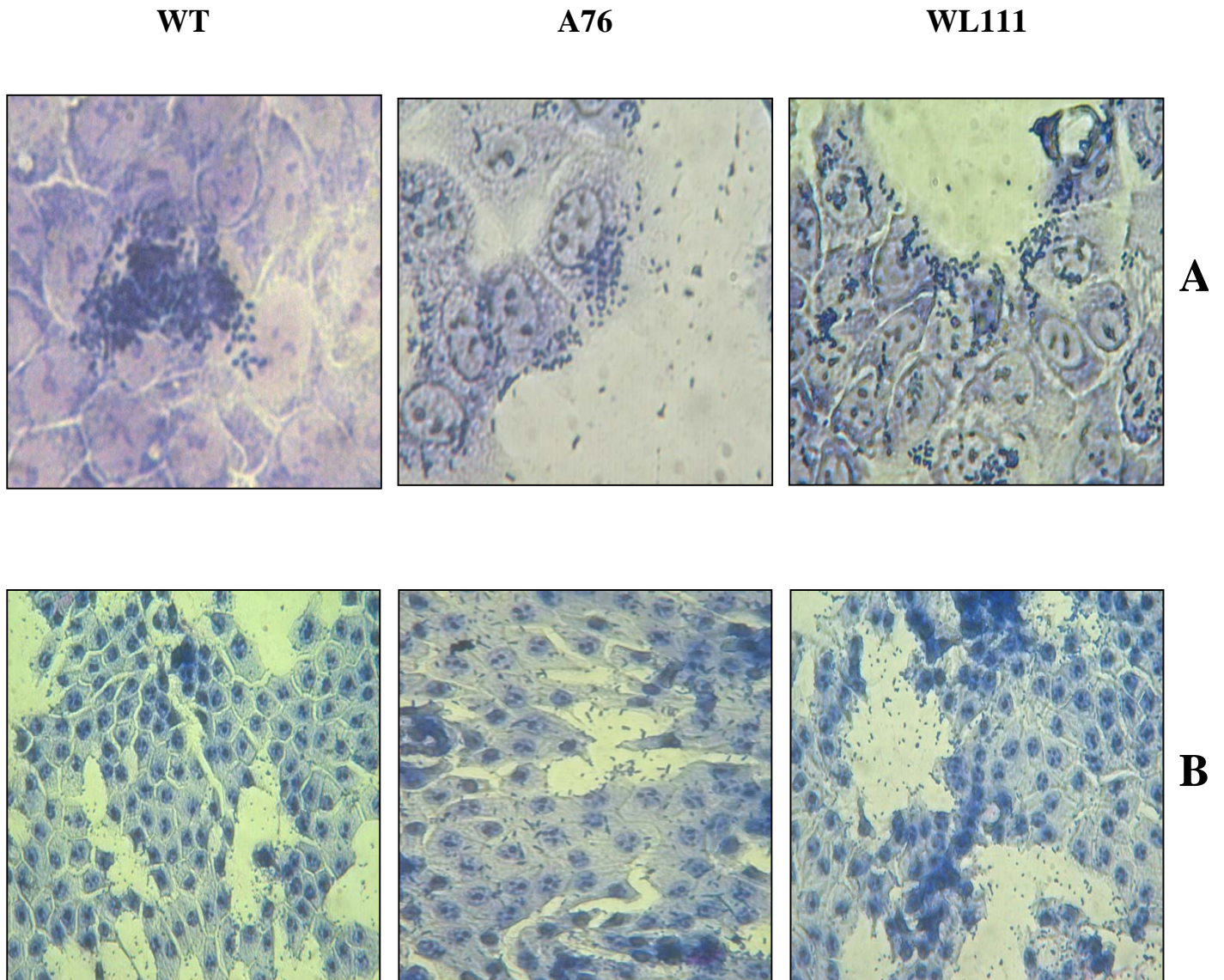
A tal fine è stata stabilita per ciascun ceppo la percentuale di adesione alle cellule Vero e alle cellule HeLa.

I tre ceppi di *Listeria monocytogenes* sono capaci di aderire alle cellule eucariotiche, anzi il numero di batteri in grado di associarsi alla superficie cellulare risulta essere maggiore almeno di una decade rispetto a quelli che riescono a penetrare. Il ceppo wild type presenta una maggiore capacità di adesione dei mutanti e il ceppo delevto per l'InlA (A76) aderisce meglio del ceppo  $\Delta$ InlB WL-111 (Fig.7 C).

I risultati ottenuti sono stati confermati dalle osservazioni al microscopio dei preparati colorati con cristallo violetto.

Tutti i ceppi di *Listeria monocytogenes* sono capaci di aderire in maniera non dipendente dal sistema cellulare utilizzato. Il profilo di adesione sembra non differire notevolmente fra i diversi ceppi: sia il ceppo wild type che i ceppi mutanti presentano un profilo adesivo di tipo "localizzato" (Fig.8 A-B).

E' stato, inoltre, osservato che aumentando il tempo di adesione da 3 a 6 h si assiste ad un significativo aumento dell'adesione batterica alle cellule Vero, mentre nel caso delle cellule HeLa si è registrato un notevole distacco cellulare.



**FIG.8. Adesione di *Listeria monocytogenes* alle cellule Vero(A) e alle cellule HeLa(B).** I ceppi di *Listeria monocytogenes* wild- type, A76 ( $\Delta$ InlA) e WL111 ( $\Delta$ InlB) mostrano un pattern adesivo di tipo “localizzato”. I batteri si legano in aree localizzate della superficie cellulare formando delle vere e proprie micro-colonie. Le cellule HeLa (B) sono più suscettibili delle cellule Vero (A) all’infezione batterica, per cui il monostrato cellulare si presenta poco omogeneo.

### 4.3. L'effetto inibitorio degli anticorpi e delle disintegrine sull' "uptake batterico"

Allo scopo di valutare la classe di integrine eventualmente coinvolte nel processo di internalizzazione batterica, sono stati effettuati saggi di inibizione dell' "uptake" sia mediante l'impiego di anticorpi monoclonali diretti contro specifiche subunità integriniche ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ), che utilizzando tre disintegrine, echistatina, flavoridina e kistrina, a dosi non citotossiche.

Le cellule Vero e HeLa sono state preincubate per 15 min con diverse concentrazioni di anticorpi anti-integrine (0.5-1000  $\mu\text{g/ml}$ ) e successivamente infettate con  $1 \times 10^6$  batteri. Gli anticorpi anti-beta1 e anti-beta3 hanno mostrato differente capacità nell'inibire l' "uptake" dei tre ceppi di *Listeria monocytogenes* (Fig.9).

Nelle cellule Vero alla concentrazione di 10  $\mu\text{g/ml}$  l'anticorpo anti-beta1 ha inibito l' "uptake" del ceppo wild type del 30%, del 50% quello del mutante A76 e del 30% quello del mutante WL-111; l'anticorpo diretto contro la subunità integrinica beta 3 è risultato invece più efficiente dell'anti-beta 1. Alla dose di 10  $\mu\text{g/ml}$  l'anti-beta 3 è capace di inibire l'internalizzazione di *Listeria monocytogenes* wild type del 45%, del 52% quella del ceppo A76 ( $\Delta\text{InlA}$ ) e del 50% il ceppo WL-111. (fig.9 A).

Anche per le cellule HeLa, l'anti-beta 3 ha mostrato maggiore capacità di inibizione dell'uptake di *L. monocytogenes* alla concentrazione di 10  $\mu\text{g/ml}$ . L' "uptake" del ceppo wild type viene inibito dall'anti-beta 1 del 25% e del 40% dall'anti-beta 3. I due mutanti sono maggiormente inibiti rispetto al ceppo wild type: per il ceppo A76 si è avuto una percentuale di inibizione del 40% dall'anti-beta 1 e del 50% dall'anti-beta 3, mentre per il WL-111 l'anti-beta 1 ha mostrato una capacità di inibizione del 20% e l'anti-beta 3 del 45% (fig.9B).

Prima di saggiare l'attività inibente delle disintegrine, è stata valutata la loro citotossicità esponendo le cellule Vero e HeLa a concentrazioni crescenti di ciascuna disintegrina (0-100  $\mu\text{g/ml}$ ) per diversi intervalli di tempo (10 min-24 h). La vitalità cellulare, valutata mediante il metodo di esclusione del Trypan blue, è risultata superiore al 90% dopo 24 h di esposizione a 100  $\mu\text{g/ml}$  di ciascuna disintegrina (dati non riportati).

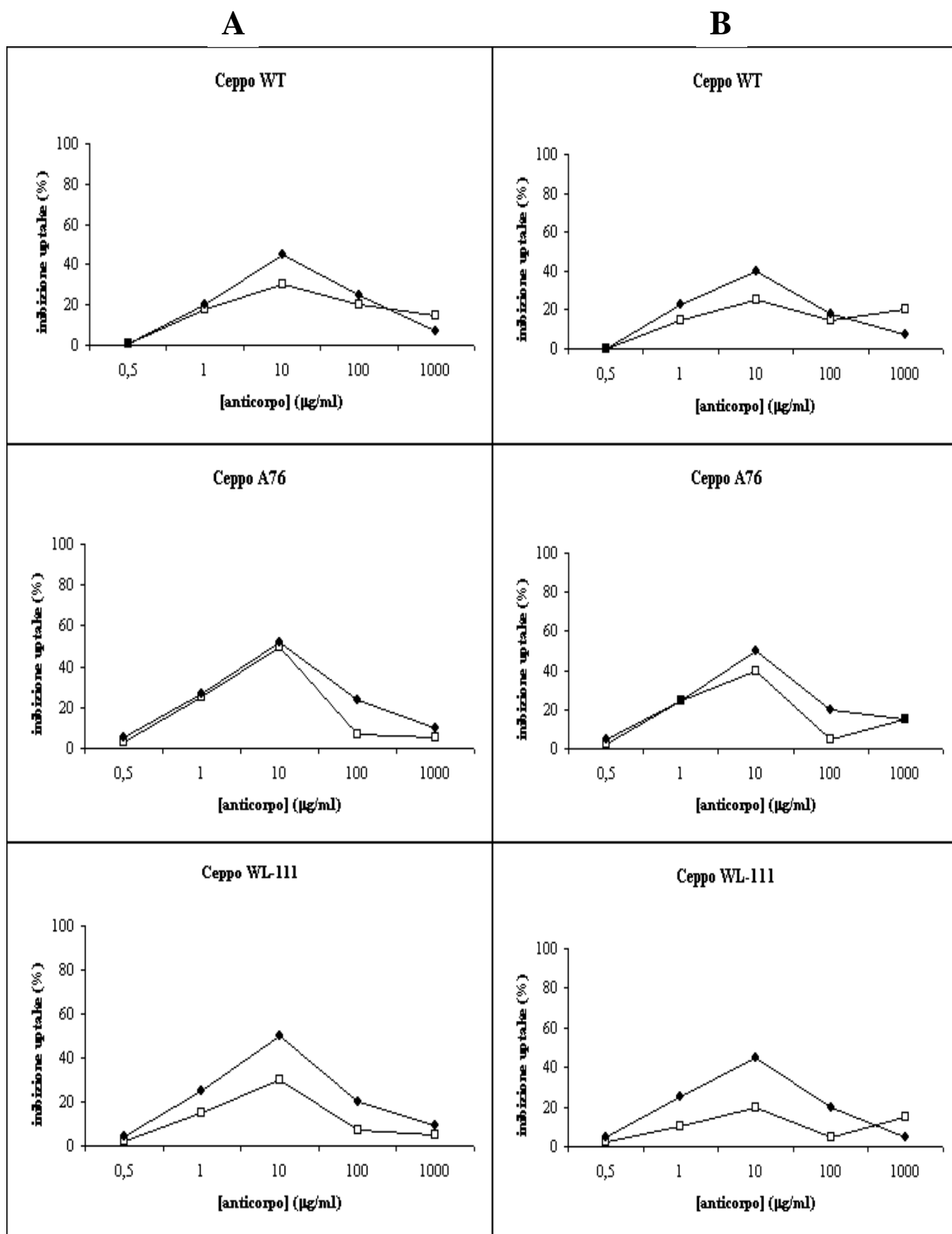
I saggi di citotossicità hanno consentito di definire per ciascuna disintegrina le dosi non citossiche da utilizzare nel saggio di inibizione batterica (0.05-1  $\mu\text{g/ml}$ ). Le disintegrine hanno mostrato differente capacità di inibizione.

L' "uptake" del ceppo wild type nelle cellule Vero è inibito del 10% dalla kistrina, del 5% dall'echistatina e dalla flavoridina alla dose di 2  $\mu\text{g/ml}$ ; le stesse dosi di disintegrine sono capaci di inibire l' "uptake" del ceppo mutante A76 rispettivamente del 40%, del 25% e del 30%, e del 35%, 25% e 30% l'invasione del ceppo WL-111 (Fig.10 A).

A dosi maggiori di disintegrine, l'effetto inibitorio aumenta: in particolare, alla dose di 10  $\mu\text{g/ml}$  la kistrina ha inibito del 23% l' "uptake" del ceppo wild type, del 57% quella del mutante A76 e del 50% del WL-111. L'echistatina alla stessa dose ha inibito i rispettivi ceppi del 15%, del 43% e del 40%; la flavoridina del 16%, del 45% e del 43% (Fig.10 A).

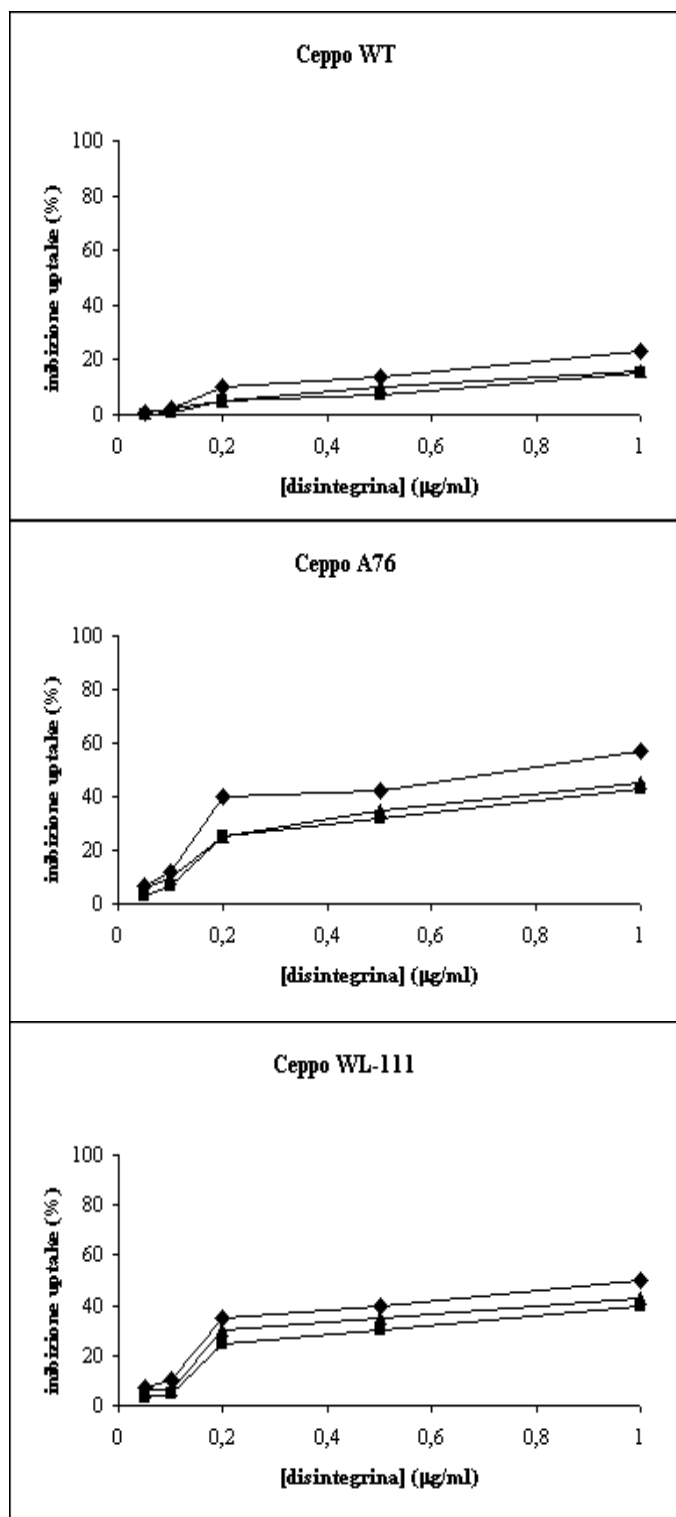
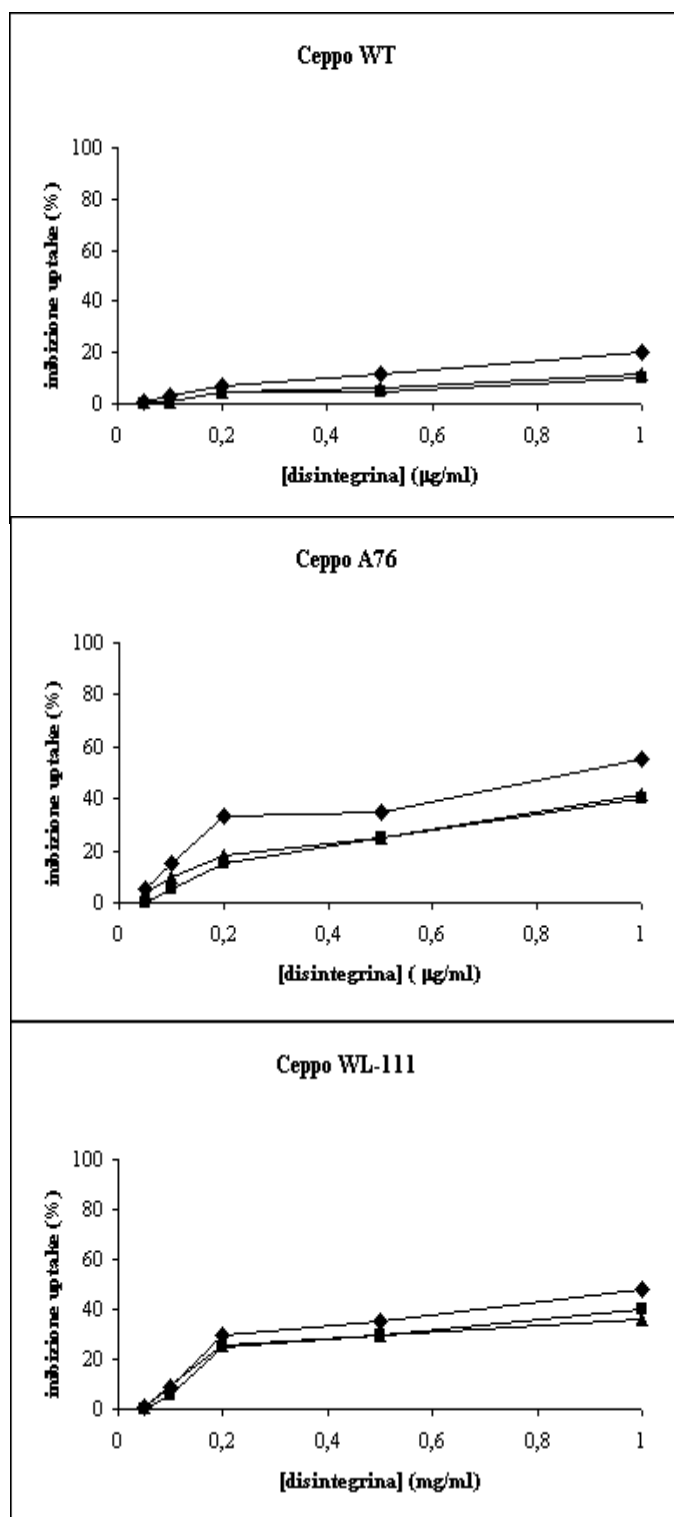
L'uptake dei tre ceppi nelle cellule HeLa è stato inibito in maniera meno efficiente, tuttavia anche in questo sistema cellulare la maggiore capacità di inibizione dell'uptake batterico è stata mostrata dalla kistrina che è molto efficiente alla concentrazione di 10  $\mu\text{g/ml}$  sul ceppo A76 (55%) rispetto al wild type (20%) e al mutante WL-111 (48%). L'echistatina e la flavoridina allo stesso modo della kistrina, inibiscono maggiormente il mutante A76 alla concentrazione di 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 10 B).

L'attività delle tre disintegrine è comunque significativa a partire da concentrazioni di 1  $\mu\text{g/ml}$  in entrambi i sistemi cellulari e per tutti e tre i ceppi (Fig.10 A-B).



**FIG.9. Inibizione anticorpale dell'uptake di *L. monocytogenes* in cellule Vero (A) e HeLa (B).**

Le cellule Vero sono state infettate con i tre ceppi di *Listeria* con MOI 3, le cellule HeLa con MOI 1. Prima dell'infezione le cellule sono state pre-incubate con anticorpo anti-beta 1 (□) e anti-beta 3 (♦) a diverse concentrazioni (0.5-1000 µg/ml). La percentuale di inibizione batterica è stata determinata calcolando il numero di batteri internalizzati nelle cellule infettate trattate con gli anticorpi e il rispettivo numero di batteri internalizzati nelle cellule di controllo (non trattate).

**A****B**

**FIG.10. Le disintegrine inibiscono l'uptake di *L. monocytogenes* in cellule Vero (A) e in cellule HeLa.** Le cellule Vero sono state infettate con una MOI pari a 3 mentre le cellule HeLa con una MOI pari a 1. Prima dell'infezione sono state trattate con echistatina (■), kistrina (◆) e flavoridina (▲) a diverse concentrazioni (0-1 µg/ml), per valutare successivamente la percentuale di inibizione batterica (n.ro batteri internalizzati in cellule trattate con disintegrine/n.ro di batteri internalizzati in cellule non trattate)

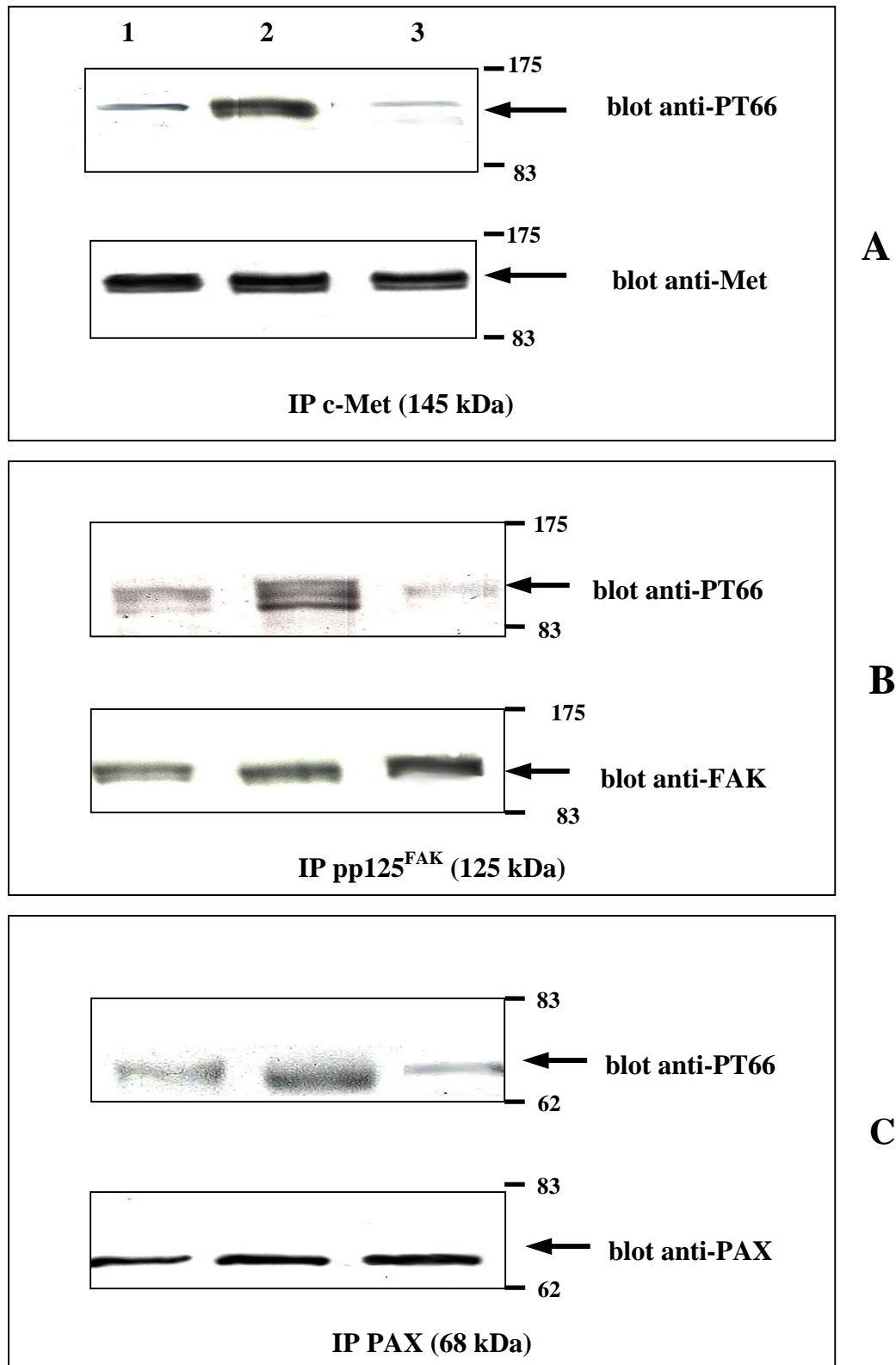
#### 4.4. L'infezione modula la fosforilazione di Met, Fak e paxillina

L'interazione di *Listeria monocytogenes* con le cellule Vero e HeLa influenza la fosforilazione di recettori e molecole coinvolte nel “signaling” cellulare. L'analisi delle vie di trasduzione del segnale coinvolte nell'“uptake” batterico è stata effettuata mediante esperimenti di immunoprecipitazione e SDS-PAGE su lisati di cellule Vero e HeLa adese a fibronectina.

I livelli di fosforilazione del recettore c-Met, di pp125<sup>FAK</sup> e di paxillina sono stati valutati prima e dopo l'infezione con *Listeria monocytogenes* wild type e mutante A76, immunoprecipitando i lisati cellulari contenenti le proteine ed effettuando un Western blotting con un anticorpo anti-fosfotirosine PT66.

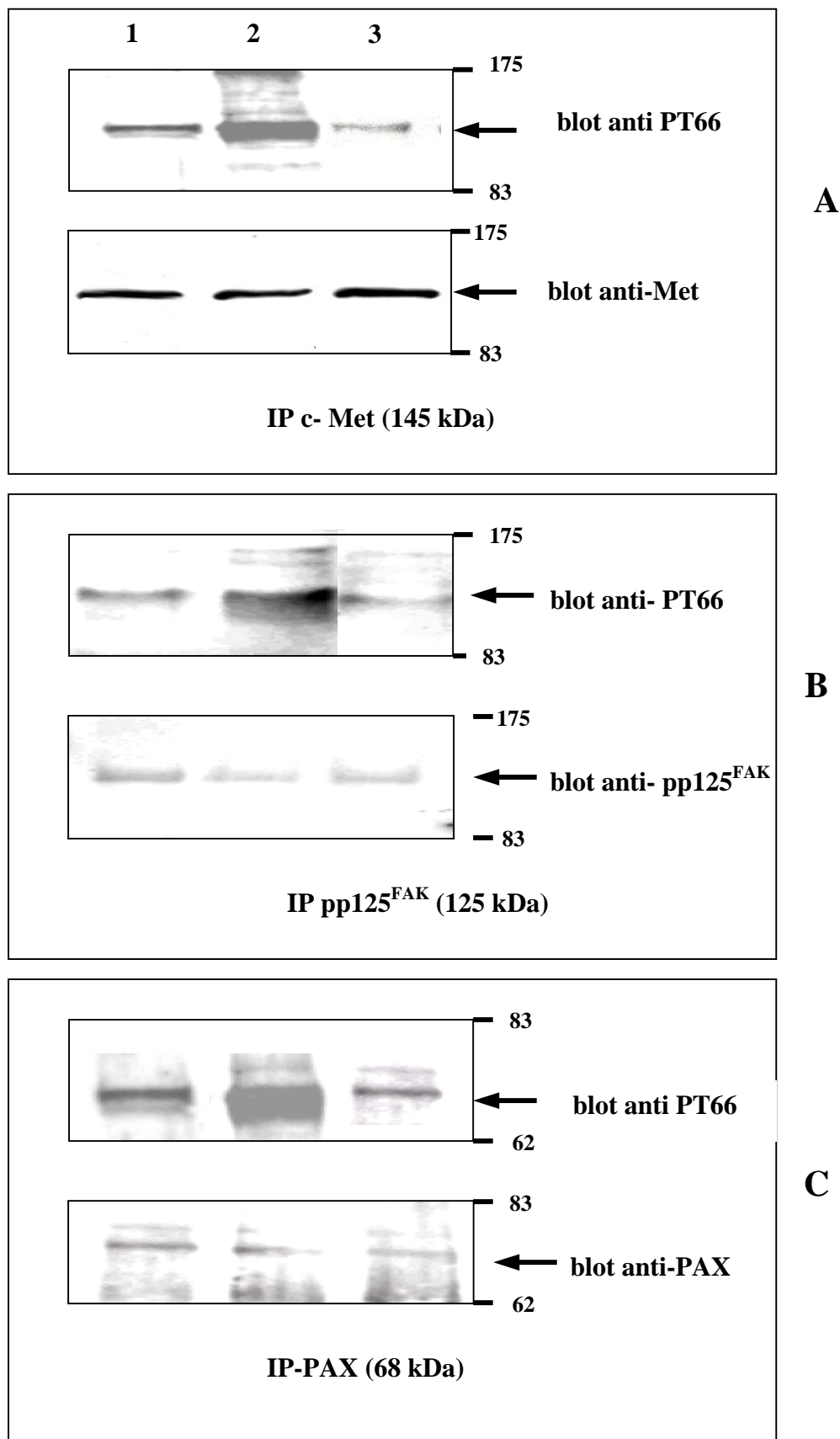
Sono state osservate differenze nei livelli di fosforilazione delle tre proteine (Fig.11-12 A, B, C, pannelli superiori). La fosforilazione di c-Met, Fak e paxillina è aumentata in seguito all'infezione per entrambi i sistemi cellulari; le differenze, però, sono state più significative per i lisati infettati con il ceppo mutante. Quando i rispettivi blots sono stati risaggiati con anticorpo anti-Met, o anti-pp125<sup>FAK</sup> o anti- paxillina, la stessa quantità di immunoprecipitato di Met, pp125<sup>FAK</sup> e paxillina è stata osservata in tutti i canali (Fig. 11-12 A, B, C, pannelli inferiori).





**FIG.11. *L' infezione di Listeria monocytogenes induce un aumento della fosforilazione di Met (A), pp125FAK (B) e paxillina (C) nelle cellule Vero adese a fibronectina.***

Le cellule Vero sono state fatte aderire a piastre ricoperte di fibronectina per 3h ( controllo, canale 3) e poi infettate con *L. monocytogenes* wild type (canale 1) e mutante A76 (canale 2). I lisati sono stati immunoprecipitati con anti- Met ( pannello sup. A), anti-FAK (pannello sup. B) e anti-paxillina (pannello sup.C) e separati mediante elettroforesi. Dopo Western blotting, le proteine fosforilate in tirosina sono state visualizzate mediante anticorpo anti- PT66. I blots sono stati strippati e ritestati con anti- Met , anti-FAK e anti-paxillina ( pannelli inf. A-B-C). I pesi molecolari sono riportati a destra.



**FIG.12.** *L' infezione di Listeria monocytogenes induce un aumento della fosforilazione di Met (A), pp125FAK (B) e paxillina (C) nelle cellule HeLa adese a fibronectina.*

Le cellule HeLa sono state fatte aderire a piastre ricoperte di fibronectina per 3h (controllo, canale 3) e poi infettate con *L. monocytogenes* wild type (canale 1) e mutante A76 (canale 2). I lisati sono stati immunoprecipitati con anti- Met ( pannello sup. A), anti-FAK (pannello sup. B) e anti-paxillina (pannello sup.C) e separati mediante elettroforesi. Dopo Western blotting, le proteine fosforilate in tirosina sono state visualizzate mediante anticorpo anti- PT66. I blots sono stati strappati e ritestati con anti- Met , anti-FAK e anti-paxillina ( pannelli inf. A-B-C). I pesi molecolari sono riportati a destra.

## 5-DISCUSSIONE

L'adesione alla superficie cellulare è il primo stadio per l'attecchimento di una malattia batterica. Per i patogeni extracellulari, l'adesione consente ai batteri di resistere ai meccanismi di eliminazione dell'ospite, per i patogeni intracellulari, l'adesione è spesso un prerequisito per l'invasione ("uptake").

Le adesine sono componenti batterici che mediano l'interazione tra i batteri e la superficie delle cellule ospiti. Molti batteri patogeni hanno evoluto la capacità di aderire alle molecole di adesione cellulare (CAMs), recettori di superficie che mediano le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare (ECM) e che vengono generalmente classificate in quattro gruppi principali: integrine, caderine, membri della superfamiglia delle immunoglobuline (IgCAMs) e selectine (100).

I batteri invasivi, contrariamente alla fagocitosi mediata dai fagociti professionali dove svolgono un ruolo fondamentalmente passivo, inducono attivamente il loro "uptake" in cellule normalmente non-fagocitiche, giocando un ruolo chiave e attivo nella complessa interazione tra microorganismo invasivo e cellula ospite (101); in questo contesto il citoscheletro rappresenta un componente importante, la cui plasticità è fondamentale ed è ottimamente sfruttata dai batteri.

La *Listeria monocytogenes* interagisce attraverso le sue due proteine superficiali, InlA e InlB, con due recettori della membrana cellulare, rispettivamente, c-Met e l'E-caderina, attivando una cascata di eventi di trasduzione di segnali all'interno della cellula che culminano con la fagocitosi.

Alla luce di tali presupposti, l'analisi della capacità della *Listeria monocytogenes* di penetrare nelle cellule Vero e HeLa è stata utilizzata per valutare i meccanismi che sono alla base della sua patogenicità.

I saggi di invasione batterica hanno dimostrato che tra MOI e "uptake" batterico esiste un rapporto di proporzionalità inversa, ascrivibile ad una possibile competizione tra batteri e/o ligandi batterici e recettori cellulari. La capacità di invasione è una prerogativa non solo del ceppo wild type dal momento che i ceppi mutanti non hanno perso la capacità di penetrazione. La riduzione dell' "uptake" dovuta alla delezione dei geni per l'*InlA* e *InlB* suggerisce come l'internalizzazione InlA e InlB-mediata è influenzata anche da altre proteine internalina-simili e non.

Ventiquattro internaline sono, infatti, codificate nel genoma di *Listeria* e potrebbero potenzialmente contribuire all'invasione delle cellule ospiti. Quattro (InlC2, InlD, InlE e InlF) sono state identificate mediante ibridizzazione delle genoteche del ceppo di *Listeria monocytogenes* EGD usando il gene dell'InlA come sonda, ma nessun ruolo è stato attribuito a queste proteine nell'invasione cellulare (56).

Un "cluster" genico che codifica le proteine InlG, InlH e InlE è stato identificato in *Listeria monocytogenes* EGD, e sembra essere richiesto per la colonizzazione della milza e del rene nei modelli murini (102).

Recentemente, un nuovo membro della famiglia delle internaline, InlJ, ha mostrato di avere un ruolo nell'infezione del topo, ma il suo coinvolgimento nell'invasione cellulare resta ancora da determinare (103).

Le differenti internaline potrebbero agire di concerto durante l' "uptake" batterico, dal momento che studi precedenti hanno dimostrato che l'ingresso InlA-mediata è incrementato in presenza di InlB e InlC, mentre in assenza di InlB è richiesta la presenza di InlG, InlH e InlE (49). Ulteriori studi sono necessari per chiarire il contributo di ciascuna internalina e il modo in cui esse cooperino durante l'invasione batterica per stabilire un'infezione favorevole in diversi tipi cellulari.

I tre ceppi di *Listeria* mostrano in generale una capacità adesiva maggiore di quella invasiva; la percentuale di adesione differisce tra il ceppo wild type e i due mutanti; esistono, quindi, differenze nel ruolo che le due internaline svolgono nell'ambito del processo infettivo.

La percentuale di adesione maggiore per il ceppo delevato per l'InlA (A76) rispetto al ceppo WLIII dimostra che l'InlB oltre a fungere da invasina, funziona in questi sistemi cellulari anche come adesina rispetto all'InlA; l'adesività del mutante WLII ( $\Delta$ InlB) è mediata probabilmente da altri fattori batterici.

Dai risultati ottenuti si evince che le internaline possono di volta in volta mediare l'adesione o l'invasione cellulare a seconda del sistema cellulare utilizzato; ciascuna linea cellulare può mostrare una permissività differente all'adesione e all' invasione cellulare; le cellule Vero risultano, infatti, più permissive delle HeLa.

Diversi studi hanno dimostrato che le due internaline sono differentemente richieste per l'invasione di vari tessuti e linee cellulari. L'InlA promuove l'internalizzazione del batterio nelle cellule epiteliali umane Caco- 2

comportandosi sia come adesina che come invasina (104), l'InlB è, invece, necessaria per l'internalizzazione negli epatociti (105) e in alcune linee cellulari epiteliali e simil-fibroblasti (106).

Studi che utilizzano mutanti di *Listeria monocytogenes* deleti o per l'InlA o per l'InlB hanno dimostrato che l'InlB, ma non l'InlA, è essenziale per l'internalizzazione in cellule endoteliali HUVECs. Il legame dell'InlB alle cellule HUVECs è specifico e fa assumere all'InlB un ruolo principalmente di adesina nell'ambito dell'internalizzazione della *Listeria* in questo sistema cellulare (107).

E' stata riportata una maggiore sensibilità delle cellule Caco-2 rispetto alle cellule HeLa ad essere invase da *Listeria monocytogenes* direttamente dipendente dalle particolari e uniche caratteristiche morfologiche delle Caco-2 (108, 109).

Altri Autori hanno dimostrato una permissività maggiore delle cellule Vero rispetto alle Caco-2, suggerendo che esse rappresentano un efficiente sistema cellulare per lo studio della patogenicità dei ceppi di *Listeria monocytogenes* (110).

Le cellule Vero risultano molto efficienti nel promuovere l' "uptake" della *Listeria*; tuttavia, le cellule HeLa sono in grado probabilmente di promuovere una rapida crescita intracellulare della *Listeria monocytogenes*.

Le condizioni sperimentali adottate nei saggi di invasione batterica differiscono per la MOI utilizzata. Una MOI 1:3 induce la migliore percentuale di "uptake" batterico nelle cellule Vero; ciò non si verifica per le cellule HeLa che necessitano di una MOI più bassa (1:1).

Questi risultati riflettono un'imponente lisi a cui il monostrato di cellule HeLa va incontro quando infettato con una MOI alta, una lisi che è il risultato di un'eccessiva invasione batterica e moltiplicazione intracellulare che le cellule HeLa sono in grado di promuovere molto più rapidamente e in maniera più efficiente delle cellule Vero.

Le osservazioni al microscopio confermano questi risultati: un'incubazione di 6 ore per le cellule HeLa è letale utilizzando una MOI alta; tuttavia, nelle condizioni sperimentali specifiche, adatte a ciascuna linea cellulare, il profilo di adesione non cambia (Fig.8).

Adottando la terminologia utilizzata da diversi Autori per descrivere i profili di adesione di ceppi di *E. coli* a diversi tipi cellulari, il tipo di adesione della *Listeria monocytogenes* alle cellule Vero e HeLa si può definire “localizzato”.

Cravioto et al. hanno descritto due tipi di adesione di *E. coli* alle cellule Hep-2: adesione diffusa (DA), quando i batteri ricoprono l'intera superficie cellulare, adesione localizzata (LA) quando l'adesione batterica è limitata a una o poche aree della superficie batterica con la formazione di vere e proprie microcolonie (99). Successivamente, Nataro et al. hanno descritto un terzo tipo di adesione denominata aggregativa (AA), in cui i batteri si ammassano a livello della superficie cellulare impilandosi gli uni sugli altri a ridosso di questa (111).

I tre ceppi di *Listeria monocytogenes* aderiscono in maniera localizzata a livello della superficie delle cellule Vero e HeLa, in corrispondenza probabilmente di quelle zone della membrana cellulare denominate “lipid rafts”(112).

Si tratta di microdomini della membrana ricchi in colesterolo, glicolipidi, e proteine ancorate al glicosilfosfatidilinositolo (GPI), dove i recettori, una volta attivati, si raggruppano e attivano la loro rispettiva cascata di eventi di trasduzione dei segnali (112).

Diversi patogeni che includono virus, batteri e parassiti richiedono l'integrità di questi domini per l'internalizzazione (113, 114, 115). L'ingresso mediato dai “lipid rafts” è stata documentata per tossine batteriche come la tossina colerica (116), la tossina antracica (117), la listeriolisina (LLO) (118). Altri batteri quali *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli* che esprimono Fim-H, e *Chlamydia* richiedono i “lipid rafts” per la loro internalizzazione o la presenza dei loro recettori bersaglio all'interno di questi microdomini (115).

L'integrità dei “lipid rafts” è richiesta per l'internalizzazione della *Listeria monocytogenes* mediata sia dall'InlA che dall' InlB, ma a differenti stadi del processo di infezione. (119).

La deplezione di colesterolo non influisce sulla quantità di E-caderina presente a livello della membrana plasmatica, ma inibisce il reclutamento del recettore a livello del sito di ingresso della *Listeria*. Affinché si verifichi un'interazione funzionale tra l'InlA e l'E-caderina, le molecole di E-caderina devono associarsi con i “lipid rafts” in modo da essere raggruppate dai batteri ed indurre la loro internalizzazione (119).

Al contrario, la deplezione di colesterolo non compromette il legame dell'InlB con Met, né inibisce il reclutamento del recettore a livello della membrana plasmatica, né la sua fosforilazione, né l'attivazione di PI3K; ad essere compromessi sono probabilmente gli eventi a valle dell'intero "signalling" InlB-mediato, che restano ancora da determinare (119).

I processi di trasduzione dei segnali cellulari mediati dall'interazione della *Listeria* con le cellule ospiti comprendono il riarrangiamento citoscheletrico, la fosforilazione/defosforilazione di tirosin chinasi, e/o di proteine adattatrici, e l'assemblaggio e il disassemblaggio delle strutture di adesione focale e delle giunzioni intercellulari, eventi che portano alla fagocitosi del microrganismo.

Questi processi sono mediati dai recettori di membrana appartenenti alla famiglia delle integrine, per cui l'utilizzo di anticorpi diretti contro le subunità integriniche e di concentrazioni non-citotossiche di disintegrine hanno consentito di identificare le integrine eventualmente coinvolte nell' "uptake" batterico.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l' "uptake" della *Listeria* è inibito in entrambe le linee cellulari dagli anticorpi anti-beta 1 e anti-beta 3.

L'integrina  $\beta_3$  è quella maggiormente coinvolta nell'"uptake" batterico, l'anticorpo diretto contro questa subunità è in grado, infatti, di esercitare un effetto maggiore sui due ceppi. A conferma del suo coinvolgimento è l'efficienza che la kistrina ha nell'inibire l'invasione batterica rispetto alle altre due disintegrine.

La differente efficienza delle disintegrine è correlabile alla loro differente affinità per le integrine: la kistrina presenta una maggiore affinità per la subunità integrinica  $\beta_3$ , la flavoridina per la subunità  $\beta_1$ , l'echistatina, invece, presenta motivi strutturali aggiuntivi alla sequenza RGD che la rendono altamente affine sia alla subunità integrinica  $\beta_1$  che alla  $\beta_3$  (120).

Nei saggi di inibizione batterica l'utilizzo degli anticorpi ha spesso determinato un aumento dell' "uptake", questa conseguenza è dovuta al cosiddetto effetto *prozona* o *cross-talk integrinico*: l'anticorpo utilizzato a concentrazioni troppo spinte può indurre l'overespressione di altri recettori eventualmente coinvolti nell'invasione batterica.

Le vie di trasduzione del segnale sono state analizzate mediante saggi di immunoprecipitazione. L'attenzione è stata focalizzata sul "signalling" mediato dall'interazione dell'InlB con il recettore per l'HGF, c-Met.

I risultati ottenuti hanno dimostrato come l'infezione influisce sull'attività di Met e di proteine associate alle placche di adesione focale, quali pp125<sup>FAK</sup> e paxillina. L'infezione ha indotto un aumento dei livelli di fosforilazione di Met. Livelli maggiori di fosforilazione si sono ottenuti in seguito all'infezione con il ceppo mutante, suggerendo cioè che l'attività di questo recettore è essenziale per l' "uptake" della *Listeria*.

Met, tuttavia, è fosforilato anche nelle cellule di controllo, la sua fosforilazione può essere, pertanto, un evento non strettamente dipendente dall'InlB, ma altri fattori possono contribuire alla sua attivazione.

pp125<sup>FAK</sup> è stata identificata come una tirosin-chinasi non recettoriale localizzata a livello delle placche di adesione focale e conosciuta per il suo ruolo nelle funzioni cellulari integrina-mediate quali la migrazione cellulare, la progressione del ciclo cellulare, la sopravvivenza cellulare. Bersaglio della trans-fosforilazione di pp125<sup>FAK</sup> è paxillina, una proteina coinvolta nella regolazione delle adesioni focali e cruciale per la trasduzione dei segnali integrinici.

La fosforilazione di pp125<sup>FAK</sup> e di paxillina è correlata con l'attivazione di Met, i loro livelli di fosforilazione hanno mostrato lo stesso andamento.

pp125<sup>FAK</sup> e paxillina assumono, pertanto, un ruolo importante nel "signaling" attivato dall'interazione dell'InlB con Met durante l'invasione di *Listeria monocytogenes*.

I nostri risultati dimostrano come pp125<sup>FAK</sup> potrebbe essere il punto di convergenza delle integrine e delle vie di trasduzione del segnale mediate dai fattori di crescita. La fosforilazione di pp125<sup>FAK</sup> è stimolata anche da fattori di crescita e potrebbe essere il risultato o dell'associazione di pp125<sup>FAK</sup> con i recettori dei fattori di crescita o/e dell'attivazione di molecole di segnale da parte dei recettori per i fattori di crescita.

Studi precedenti hanno dimostrato che la fosforilazione in tirosina di pp125<sup>FAK</sup> stimolata dai fattori di crescita incrementa la sua associazione con molecole effettrici, inducendo un'amplificazione dei segnali a valle.



E' stato dimostrato che pp125<sup>FAK</sup> integra i segnali dei recettori dei fattori di crescita e delle integrine per facilitare la migrazione cellulare.(121)

La caratterizzazione dei processi che sono alla base dell'interazione della *Listeria monocytogenes* con le cellule ospiti consentono di chiarire i meccanismi responsabili della sua patogenicità, ma rappresentano anche un valido strumento per comprendere meglio il ruolo dei recettori nelle infezioni batteriche e nell'ambito della biologia dell'invasione tumorale.

Le molecole di adesione cellulare quali le integrine sono, infatti, coinvolte nella patogenesi di diverse malattie sostenute da protozoi, funghi, batteri e virus e, attualmente, l'utilizzo di antibiotici per il trattamento di queste malattie è stato limitato per lo sviluppo del fenomeno della resistenza.

La scoperta degli antibiotici (1927) ha senz'altro costituito una tappa fondamentale per la tutela della salute pubblica. Prima della loro introduzione negli anni '40-'50, un'infezione da *Streptococcus pneumoniae* era quasi sempre letale. La disponibilità degli antibiotici ha radicalmente modificato questo scenario nefasto e dagli anni '50-'60 rapidamente sono stati introdotti sul mercato nuove classi di agenti antibatterici. Nonostante i progressi avvenuti, le infezioni batteriche costituiscono un problema tutt'altro che risolto dal momento che i microrganismi riescono ad acquisire rapidamente elementi genetici che conferiscono resistenza agli agenti antibatterici.(122)

I risultati di questo lavoro potrebbero essere utili per lo sviluppo di strategie alternative per il trattamento delle malattie infettive, in cui le integrine potrebbero rappresentare nuovi bersagli molecolari. Il motivo RGD è presente in molte proteine batteriche e media il legame alle integrine umane; peptidi sintetici RGD potrebbero rappresentare potenziali agenti terapeutici per varie malattie sostenute da agenti patogeni.

Il coinvolgimento nel processo di infezione della *Listeria monocytogenes* di Met, pp125<sup>FAK</sup> e paxillina dimostra come l'attività delle tirosin-chinasi sia essenziale per l' "uptake" batterico.

I risultati ottenuti permettono di proporre diversi meccanismi per bloccare l'internalizzazione della *Listeria*: inibire alcune funzioni batteriche, agire sulla vitalità batterica, ridurre la capacità delle proteine

batteriche di legare recettori cellulari, bloccare la trasduzione di un segnale di “uptake”, attivare qualche attività antibatterica nelle cellule ospiti, inibire la capacità fagocitica delle cellule ospiti.

Met, pp125<sup>FAK</sup> e paxillina hanno un ruolo anche in altri processi cellulari che vanno al di là dell’infezione batterica.

L’inappropriata attivazione del “signalling” di Met è stata implicata nell’eziologia di diversi tumori umani e nel conferimento di proprietà invasive e metastatiche alle cellule neoplastiche (123, 124). In maniera simile è stato osservato che in una varietà di tumori invasivi umani c’è un aumento dei livelli di pp125<sup>FAK</sup> implicato nell’ambito della progressione tumorale verso un fenotipo invasivo.(125)

Lo studio di questi recettori pone le basi per strategie innovative nell’ambito anche della biologia dei tumori dove diventa di importanza fondamentale l’identificazione di markers diagnostici e di bersagli terapeutici.

## 6- BIBLIOGRAFIA

1. Cossart, P., Gellin, B.G., and Broome, C.V.  
Listeriosis.  
*J. Am. Med. Assoc.* 261:1313-1320, 1989
2. Murray, E.G.D., Webb R.A., and Swann M.B.R.  
A disease of rabbits characterized by large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes* (n. sp.).  
*J. Pathol. Bacteriol.* 29: 407-439, 1926.
3. Gray, M. L., Killinger A.H.  
*Listeria monocytogenes* and listeric infections  
*Bacteriol Rev.* 30(2):309-82, 1966
4. Poli G., Cocilova A.,  
Microbiologia e immunologia veterinaria. UTET Torino, 261-262, 2001
5. Boone D.R., Castenholz R.W. editors  
The Archea and the deeply branching and phototropic bacteria,  
*Bergey's Manual of Systematic bacteriology*. New York Springer .Vol. 1, 2001
6. La Placa  
*Listeria monocytogenes*

*Principi di Microbiologia medica* - Ottava Edizione- Società Editrice Esculapio, 250-252, Bologna, 2000

7. Gualandi G.

*Listeria*

*Trattato di Malattie Infettive degli animali* II ed., a cura di Renato Farina, Franco Scamozza, UTET, Torino 22: 285-293, 2004

8. Donnelly C.W.

*Listeria monocytogenes*

*Foodborne Disease Handbook, Diseases Caused by Bacteria* edited by Y. H. Hui, J. Richard Gorham, K. D. Murrell, Dean O. Cliver, Marcel Dekker, Inc. , 8: Vol.1215-252, 1994

9. Rocourt J., Cossart P.

*Listeria monocytogenes*

*Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* edited by Doyle M.B., Beuchat L.R., Montville T.J.: 337-352. ASM Press, Washington D.C., 1997

10. Cantoni C.

Intossicazioni e tossinfezioni alimentari – *Listeria monocytogenes*

*Kramer J., Cantoni C., Alimenti: Microbiologia e Igiene, 2a edizione, OEMF, Milano, 49-5336*

11. Organisation Mondiale de la Santé Animal (OIE),

*Listeria monocytogenes*

*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* Chapter 2.10.14, 2004

12. Walker T. S.,

*Listeria monocytogenes* in Batteri zoonotici

*Microbiologia*. Cap. 10: 206-210 EDISES, 2001

13. Poli G., Cocilova A.

*Microbiologia e immunologia veterinaria*. 261-262, UTET Torino, 2001

14. Ivanek R., Grohn Y.T., Wiedmann M

*Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling.

*Foodborne Pathog. Dis.* 3: 319-336, 2006

15. Bauda P., Monfort P.

Agents pathogènes et modifications des environnements: quels risques actuels et futurs?

*Environnement, risques et santé*. 3:165-172, 2004

16. Hof H.

History and epidemiology of listeriosis.

*FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35: 199-202, 2003

17. Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCraig L.F., Breese S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V.).

Food-related illness and death in the United States.

*Emerg. Infect. Dis.* 5:607-625, 1999

18. Doganay M..

Listeriosis: clinical presentation.

*FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35:173-175, 2003

19. Notermans S., Dufrenne J., Teunis P., Chackraborty T.

Studies on the risk assesment of *Listeria monocytogenes*.

*J. Food Prot.* 61: 24-248, 1998

20. Rizzo C., Luzzi I., Caprioli A., Ciofi degli Atti M.L.

Disamina dei dati nazionali disponibili in materia di zoonosi, con particolare attenzione ai focolai di tossinfezione alimentare (TA)

21. Serraino A., Poda G., Sanguinetti V., Bucci Sabattini M.A., Ricci B., Alberghini L., Rosmini R.

Presenza di *Listeria* spp. in uno stabilimento di produzione di salsiccia fresca: considerazioni igienico-ispettive,

*Atti Sisvet.* Vol.LIII: 327-3286,1999

22. European Food Safety Authority (EFSA)

The Community Summary Report of Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005

*The EFSA Journal.* 94, 2006

23. Direttiva 2003/99 CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003, sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 12/12/2003, Serie L, 325/331

24. Decreto Legislativo 4 aprile 2006, n. 191, “Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti di zoonotici”, Gazzetta Ufficiale n. 119, 24 maggio 2006
25. J.A. Vazquez-Boland, et al.  
Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*  
*Microb Infect.* 3 (7): 571-584, 2001
26. Bierne H., Sabet C., Personnic N., Cossart P.  
Internalins: a complex family of leucine-rich repeat- containing proteins in *L. monocytogenes*  
*Microbes Infect.* 9:1156-116, 2007
27. Sarkis K Mazmanian, Gwen L., Hung Ton-That, Olaf S.  
*Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall.  
*Science.* 30; 285(5428):760-3,1999
28. Hung Ton-That, Sarkis K. Mazmanian, Kym F. F., and Olaf S.  
Anchoring of Surface Proteins to the Cell Wall of *Staphylococcus aureus* Sortase catalyzed in vitro transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH<sub>2</sub>-GLY<sub>3</sub> substrates  
*J Biol Chem.* 275 (13): 9876-9881, 2000
29. Garandeau C., et al.  
The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence  
*Infect Immun* 70 (3): 1382-1390, 2002
30. Seveau S., Pizarro-Cerda J.

Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion

*Microb. Infect.* 9: 1167-1175, 2007

31. Hamon M., Bierne H., Cossart P.

*Listeria monocytogenes*: a multifaceted model.

*Nat Rev Microbiol.* 4(6):423-34, 2006

32. Schubert W., Urbanke C., Ziehm T., Beier V., Machner M., Domann E., Wehland J., Chakraborty T., Heinz D.

Structure of Internalin, a Major Invasion Protein of *Listeria monocytogenes*, in Complex with Its Human Receptor E-Cadherin

*Cell* 111 (6): 825 – 836,

33. Lecuit M., Dramsi S., Gottardi C., Fedor-Chaiken M., Gumbiner B., Cossart P. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*.

*EMBO J.* 18(14): 3956–3963, 1999

34. Lecuit M., Vandormael-Pournin S., Lefort J., et al.

A transgenic model for listeriosis : role of internalin in crossing the intestinal barrier.

*Science.* 292:1722-1725, 2001

35. Mengaud J., Ohayon H., Gounon P., Mège R., Cossart P.

E-Cadherin Is the Receptor for Internalin, a Surface Protein Required for Entry of *L. monocytogenes* into Epithelial Cells .

*Cell* . 84(6 ):923 - 932



36. Pentecost M., Otto G., Theriot J.A., Amieva M.R.

*Listeria monocytogenes* invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion.

*PLoS Pathog* 2(1): 3, 2006

37. Lecuit M., et al.

Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E- cadherin.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (16): 6152-6157, 2004

38. Lecuit M.

Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers

*Clin Microbiol Infect.* 11(6):430-6, 2005

39. Braun L., Ghebrehiwet B, and Cossart P.

gC1qR/p32, a C1q- binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*.

*EMBO J* 19: 1458-1466, (2000)

40. Jonquiers R., Pizarro- Cerda J., and Cossart P.

Synergy between the N- and C- terminal domains of InlB for efficient invasion of non- phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*.

*Mol Microbiol* 42: 955-965, 2001

41. Marino M., Banerjee M., Jonquiers R., Cossart P., and Ghosh P.

GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands.

*EMBO J.* 21:5623-5634, 2002

42. Bierne H., and Cossart P.

InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and growth factor.

*J. Cell Science.* 115: 3357-3367, 2002

43. Shen Y., et al.

InlB-independent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase.

*Cell.* 103:501-510, 2000

44. Furge K., Zhang Y. W., and Vande Woude G. F.

Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins.

*Oncogene.* 19:5582-5589, 2000

45. Stella M. C., Comoglio P. M.

HGF, multifunctional growth factor controlling cell scattering.

*Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31:1357-1362, 1999

46. Trusolino L., and Comoglio P.M.

Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth.

*Nat. Rev. Cancer* 2: 289-299, 2002

47. Engelbrecht F., et al.

A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins.

*Mol Microbiol.* 21(4):823, 1996

48. Chatterjee S. S., Hossain H., Otten, Kuenne C., Kuchmina K., Machata S., Domann E., Chakraborty T., and Hain T.

Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*.

*Infect Immun.* 74(2):1323, 2006

49. Bergmann B., Raffelsbauer D., Kuhn M., Goetz M., Hom S., Goebel W.

InlA- but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins

*Mol Microbiol.* 43(3):557-70, 2002

50. Alonso A, et al.

Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens.

*Int. Microbiol.* 7:81-91, 2004.

51. Cossart P., and Sansonetti P.

Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens.

*Science.* 304:242-248, 2004

52. Bierne H., et al..

The invasion protein InlB from *L. monocytogenes* activates PLC- $\gamma$ 1 downstream from PI3K.

*Cell Microbiol.* 2: 465-477, 2000

53. Mansell A., et al.

A novel function of InlB from *L. monocytogenes*: activation of NF- $\kappa$ B in 774 macrophages.

*Cell Microb.* 2:127-136, 2000

54. Seveau S., et al.

Role of lipid rafts in E- cadherin and HGF-R/Met mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells

*J. Cell.Biol.* 166 (5): 743- 753, 2004

55. Lecuit M. et al.

Internal of *Listeria monocytogenes* with an intact leucin- rich repeat region is sufficient to promote internalization.

*Infect. Immun.* 65 (12): 5309-5319, 1997

56. Dramsi S., Dehoux P., Lebrun M., Goossens P.L., Cossart P.

Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD.

*Infect. Immun.* 65:165-25, 1997

57. Domann E., et al.

Identification and characterization of a novel PrfA- regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine- rich repeats.

*Infect immun.* 65: 101-109, 1997

58. Isberg R., Tran Van Nhieu G.

Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors.

*Trends Microbiol.* 2:10-4, 1994

59. Gumbiner B. M.

Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis

*Cell* 84:345-347, 1996

60. Johnson, R.P., Craig S.W.

F- actin binding site masked by intramolecular association of vinculin head and tail domains.

*Nature* 373: 261-264, 1995

61. Hanks S.K., Polte T.R.

Signaling through focal adhesion kinase.

*Bioessays* 19: 137-145, 1997

62. Vuori K., et al.

Introduction of p130<sup>CAS</sup> signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinase.

*Mol Cell. Biol.* 16:2606-2613, 1996

63. Salgia R., et al.

Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by p120<sup>BCR/ABL</sup>.

*J Biol Chem.* 270:5039-5047, 1995

64. Thomas J.W., et al.

The role of focal adhesion kinase in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin.

*J. Biol. Chem.* 274: 36684-36692,1999

65. Lewis.J.M., Schwartz M.A.

Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl

*J. Biol. Chem.* 273:14225-14230.1998

66. Bellis S.L., et al.

Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin.

*Biochem J.* 325:375-381,1997

67. Liu S., et al.

Binding of paxillin to  $\alpha 4$  integrins modifies integrin-dependent biological response.

*Nature* 402: 676-681,1999

68. Casamassima A., Rozengurt E.

Insulin-like growth factor I stimulates tyrosine phosphorylation of p130<sup>CAS</sup>, focal adhesion kinase, and paxillin.

*J. Biol. Chem.* 273:26149-26156,1998

69. Zhu W.Y., et al.

Retinoic acid increases tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in MCF-7 human breast cancer cell.

*Cancer Res.* 59:85-90,1999

70. Payne NR, Horwitz MA.

Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors

*J Exp Med.* 166(5):1377-89, 1987

71. Relman D., Tuomanen E., Falkow S., Golenbock D.T., Saukkonen K., Wright SD.

Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: Macrophage CR3 ( $\alpha_M\beta_2$ , CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*

*Cell.* 61(7):1375-82, 1990

72. Russell DG, Wright SD.

Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania promastigotes*

*J Exp Med.* 68(1) :279-92, 1988

73. Fowler T., Wann E.R., Joh D., Johanson S., Foster T.J., Hook M.

Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MDCRAMMs and host cell beta 1 integrin

*Eur J Cell Biol* 79 (10): 672-9, 2000

74. Sinha B., Francois P. P., Nusse O., Foti M., Hartford O. M., Vaudaux P., Foster T. J., Lew D.P., Hermann M., Krause K.H..

Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha_5\beta_1$

*Cell Microb.* 1: 101-117,1999

75. Hamzaoui N., Kernéis S., Caliot E., and Pringault E.  
Expression and distribution of  $\beta 1$  integrins in *in vitro*-induced M cells: implications for *Yersinia* adhesion to Peyer's patch epithelium  
*Cell Microb.* 6: 817-828, 2004
76. Scibelli A., Matteoli G., Roberto S., Alimenti E., Dipineto L., Pavone L. M., Della Morte R., Menna L. M., Fioretti A., and Staiano N.  
Flavoridin inhibits *Yersinia enterocolitica* uptake into fibronectin-adherent HeLa cells.  
*FEMS Microb Lett* 247: 51-57, 2005
77. Alrutz M.A., and Isberg R.R.  
Involvement of focal adhesion kinase in invasin-mediated uptake  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13658-13663, 1998
78. Trusolino L., Bertotti A., Comoglio P.M.  
A signaling adapter functions for  $\alpha_6\beta_4$  integrin in the control of HGF- dependent invasive growth.  
*Cell.* 107: 643-654, 2001
79. Chung J., Yoon S., Lipscomb E. A, and Mercurio A. M.  
The Met eceptor and  $\alpha_6\beta_4$  integrin can function indipendently to promote carcinoma invasion.  
*J Biol Chem.* 279: 32287-93, 2004
80. Chen S.Y., Chen H.C.



Direct Interaction of Focal Adhesion Kinase (FAK) with Met Is Required for FAK To Promote Hepatocyte Growth Factor-Induced Cell Invasion

*Mol Cell Biol.* 26(13):5155-67, 2006

81. Gould R. J., et al.

Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms.

*Proc Soc.Exp.Biol.Med.* 195:168-71.1990

82. Juan J. Calvete.

Structure- Function Correlations of Snake Venom Disintegrin.

*Curr Pharmaceutic Design.* 11:829-835,2005

83. Rouslathi E., Pierschbacher M.

New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins.

*Science.* 238:491-7,1987

84. Marcinkiewicz C., et al.

Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 and  $\alpha$ (v)  $\beta$ 3 integrins and expression of ligand-induced binding site.

*Blood* 4:1565-75,1997

85. Calvete J.J., Jürgens M., Marcinkiewicz C., Romero A., Schrader M., and Niewiarowski S.

Disulphide-bond pattern and molecular modelling of the dimeric disintegrin EMF-10, a potent and selective integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 antagonist from *Eristocophis macmahoni* venom.

*Biochem J.* 345 (3):573-81,2000

86. Fujii Y., Okuda D., Fujimoto Z., Morita T., Mizuno H.,  
Crystallization and preliminary crystallographic studies of dimeric disintegrins from the venom of two  
Agkistrodon snakes.  
*Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 58(1):145-7, 2002
87. Brando C., Marcinkiewicz C., Goldman B., McLane M.A., and Niewiarowski S.  
EC3, a Heterodimeric Disintegrin from *Echis carinatus*, Inhibits Human and Murine  $\alpha 4$  Integrin and  
Attenuates Lymphocyte Infiltration of Langerhans Islets in Pancreas and Salivary Glands in Non-  
obese Diabetic Mice  
*Biochem Biophys. Res. Commun.* 267:413-417, 2000
88. Huang T.F.  
What have snakes taught us about integrins?  
*Cell Mol Life Sci* 54: 527-409, 1998
89. Cook J.J, et al.  
Inhibition of platelet hemostatic plug formation by trigramin, a novel RGD-peptide.  
*Am J Physiol.* 256(4-2):1038-43.,1989
90. Senn H., and Klaus W.  
The nuclear magnetic resonance solution structure of flavoridin, an antagonist of the platelet GP IIb-  
IIIa receptor.  
*J. Mol. Biol.*232: 907-925, 1993
91. Staiano, N., Villani G.R.D., Di Martino E., Squillacioti C., Vuotto P., Di Natale P.

Echistatin inhibits the adhesion of murine melanoma cells to extracellular matrix components.

*Biochem. Mol. Biol.* 35:11-19,1995

92. Staiano N., Garbi C., Squillacioti C., Esposito S., Di Martino E. Belisario M.A., Nitsch L., Di Natale P.

Echistatin induces decrease of pp125FAK phosphorylation, disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesion, and detachment of fibronectin-adherent melanoma cells.

*Eur. J. Cell. Biol.* 73:298-305, 1997

93. Staiano N., della Morte R., Di Domenico C., Tafuri S., Squillacioti C., Belisario MA, Di Natale P.

Echistatin inhibits pp72<sup>Syk</sup> and pp125<sup>FAK</sup> phosphorylation in fibrinogen-adherent platelets.

*Biochimie* 79: 769-773,1997

94. Spalletti-Cernia D., Squillacioti C., Della Morte R., Laccetti P. Staiano N.

Echistatin inhibits Lewis lung carcinoma cell-matrix adhesion in vitro and experimental metastasis in vivo.

*Int. J. Oncol.* 11:757-763, 1997

95. Scaloni A., Di Martino E., Miraglia N., Pelagalli A., Della Morte R., Staiano N., and Pucci P.

Amino acid sequence and molecular modelling of glycoprotein IIb-IIIa and fibronectin receptor iso-antagonists from *Trimeresurus elegans* venom.

*Biochem J.* 319(3): 775–782,1996

96. Sato M.

Echistatin is a potent inhibitor of bone resorption in culture.

*J. Cell Biol* 11:1713-1723, 1990

97. Beviglia L., et al. (1993).

Mouse antithrombotic assay. Inhibition of platelet thromboembolism by disintegrins .

*Thromb.Res* .71,301-15, 1993

98. Yasuda T., Gold H.K., Leinbach R.C., Yaoita H., Fallon J.T, Guerriero L., Napier M.A., Bunting S. and Collen D.

Kistrin, a polypeptide platelet GPIIb/IIIa receptor antagonist, enhances and sustains coronary arterial thrombolysis with recombinant tissue-type plasminogen activator in a canine preparation.

*Circulation*. 83:1038-1047, 1991

99. Cravioto A., Gross R. J., Scotland S. M., and Rowe B.

An adesive factor found in strains of E. coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes

*Curr. Microbiol*. 3: 95-99, 1979

100. Juliano R.L

Signal transduction by cell adhesion receptors and cytoskeleton: function of integrins, cadherins, selectins and immunoglobulin-superfamily members.

*Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:283-323, 2002

101. Finlay B. B., Cossart P.,

Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens.

*Science*. 276: 718, 1997

102. Raffelsbauer D., et al.

The gene cluster in inlC2DE of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice.

*Mol Gen Genet* 260 (2-3):144-158, 1998

103. Sabet C., et al.

LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence.

*Infect Immun* 73 (10): 6913-6922, 2005

104. Gaillard J. L., Berche P., Frehel C., Gouin E., Cossart P.

Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci

*Cell*. 65(7):1127-41, 1991

105. Dramsi et al.

Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family

*Mol Microbiol* 16:251-261,1995

106. Lingnau A., Domann E., Hudel M., Bock M., Nichterlein T., Wehland J., Chakraborty T.

Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms.

*Infect Immun*. 63(10): 3896–3903, 1995

107. Shreemanta K. Parida et al.

Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells

*Mol Microbiol* 28 (1): 81-93, 1998

108. Francis M. S. and Thomas C.J.

Effect of multiplicity of infection on *Listeria monocytogenes* pathogenicity for HeLa and Caco-2 cell lines.

*J. Med. Microbiol.* 45: 323-330, 1996

109. Rousset M.

The human colon carcinoma cell lines Ht-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation.

*Biochimie* 68, 1035-1040, 1986

110. Yamada F., Ueda F., Ochiai Y., Mochizuki M., Shoji H., Ogawa-Goto K., Sata T., Ogasawara K., Fujima A., Hondo R.

Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco- 2 cells.

*J Microbiol Methods.* 66(1):96-103, 2006

111. Nataro J. P., Kaper J. B., Robins- Browne R., Prado V., Vial P. and Levine M.M.

Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells.

*Pediatr.Infect. Dis. J.* 6: 829-831, 1987

112. Rajendran L., Simons K

- Lipid rafts and membrane dynamics.  
*J. Cell Sci.* 118:1099-1102, 2005
113. Sieczkarski S., Whittaker G. R.  
Dissecting virus entry via endocytosis  
*J Gen Vir.* 83: 1535-1545, 2002
114. Duncan M. J, Shin J. S. and Abraham S.N  
Microbial entry through caveolae: variations on a theme.  
*Cell Microbiol* 4: 783-791, 2002
115. Lafont F. and van der Goot F. G.  
Bacterial invasion via lipid rafts.  
*Cell Microbiol.* 7:613-620, 2005
116. Orlandi P.A and Fishman P.H,  
Filipin-dependent inhibition of colera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains.  
*J. Cell Biol.* 141:905-915, 1998
117. Abrami L., Liu S., Cosson P., Leppla S. H., and van der Goot F. G.  
Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via alipid raft-mediated clathrin- dependent process.  
*J. Cell Biol* 160:321-328, 2003
118. Gekara N.O, and Weiss S.

Lipid rafts clustering and signalling by listeriolysin O.

*Biochem. Soc. Trans.* 32: 712-714, 2004

119. Sevau S., Bierne H., Giroux S., Prevost M.C., and Cossart P.

Role of lipid rafts in E- cadherin- and HGF-R/ Met- mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells.

*J Cell Biol* 166(5):743-753, 2004

120. Wierzbicka-Patynowski I., Niewiarowski S., Marcinkiewicz C., Calvete J.J., Marcinkiewicz M.M., McLane M.A..

Structural Requirements of Echistatin for the Recognition of  $\alpha_v \beta_3$  and  $\alpha_5 \beta_1$  Integrins

*J Biol Chem.* 274(53):37809-14, 1999

121. Po-Chao Chan, Chun-Chi Liang, Kuo-Ching Yu, Ming-Chen Chang, William L. Ho, Bor-Huah Chen, and Hong-Chen Chen

Synergistic Effect of Focal Adhesion Kinase Overexpression and Hepatocyte Growth Factor Stimulation on Cell Transformation

*J. Biol. Chem.* 277(52): 50373-50379, 2002

122. Coates A., et al.

The nature challenger facing the development of new antimicrobial drugs

*Nat Rev Drug Disc* 1: 895-910, 2002

123. Beviglia L., Matsumoto K., Lin C.H., Ziober B. L., Kramer R.H



Expression of the C-Met/HGF receptor in human breast carcinoma: Correlation with tumor progression.

*Int. J. Cancer* 74:301-309, 1997

124. Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, Valente G, Giordano S, Cortesina G, Comoglio PM.

Somatic mutations of the *MET* oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas

*Oncogene* 19(12):1547-55, 2000

125. Mahima Agochiya, Valerie G Brunton, Dewi W Owens, E Kenn

Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells

*Oncogene* 18: 5646-5653, 1999

## **7- RINGRAZIAMENTI**

Si ringraziano i gruppi di ricerca coordinati dalla prof. Norma Staiano (Dipartimento di Strutture, Funzioni e Tecnologie Biologiche dell' Università di Napoli Federico II) e dal Dott. Federico Capuano (Direttore Dipartimento Territoriale della Campania - Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno) che hanno contribuito alla realizzazione del lavoro sperimentale.

Un particolare ringraziamento al Prof. Giuseppe Iovane, Direttore dell' Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno- sede centrale Portici- che ha messo a disposizione le strutture dell'istituto, indispensabili per lo svolgimento dell'attività di ricerca.

Un doveroso ringraziamento al Dott. Maurizio Viscardi (Dipartimento Sanità Animale - U.O. Biotecnologie - IZSM Portici) per la supervisione dell'intera sperimentazione, alla Dott.ssa Simona Tafuri (Dipartimento di Strutture, Funzioni e Tecnologie Biologiche dell' Università di Napoli Federico II) per la collaborazione nella sperimentazione biochimica e ai Tecnici Roberto Iannone e Sergio Brandi ( Dipartimento Sanità Animale – U.O. Virologia – IZSM Portici) per il contributo nell' allestimento delle colture cellulari.